VERGLEICH DES GLYKOSIDMUSTERS VON DIGITALIS LANATA MIT DIGITALIS LANATA SUBSPEZIES LEUCOPHAEA VERSCHIEDENER HERKÜNFTE.

DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften dem Fachbereich
Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JOACHIM PADBERG
aus Essen

1980

81 91

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0057

VERGLEICH DES GLYKOSIDMUSTERS VON DIGITALIS LANATA MIT DIGITALIS LANATA SUBSPEZIES LEUCOPHAEA VERSCHIEDENER HERKÜNFTE.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften dem Fachbereich
Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Joachim Padberg
aus Essen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	16.Dezember 1980
Dekan:	Prof.Dr.E.Reinhard
1.Berichterstatter:	Prof.Dr.E.Reinhard
2.Berichterstatter:	Prof.Dr.H.Auterhoff

Herrn Professor Dr.E.Reinhard danke ich herzlich für die Übertragung des Themas, sein Interesse an der Arbeit und seine jederzeit freundliche Unterstützung bei deren Durchführung.

Herrn Dr.F.Kaiser von der Firma Boehringer Mannheim danke ich für viele wertvolle Hinweise sowie für die Überlassung von Vergleichsubstanzen, Säulenfraktionen des Blattextraktes einer Digitalis leucophaea und einiger Vergleichswerte der DC-Direktfluorimetrie.

INHALTSVERZEICHNIS:

Verzeichnis der Abkürzungen 1

A.)EINLEITUNG

1.)Kurze Übersicht über die systematische Gliederung der Gattung Digitalis L. 2

2.)Kurzer historischer Rückblick zur Digitalisforschung 4

3.)Kurzer Überblick zur Entwicklungsgeschichte der Untersuchungsmethoden in der Digitalisforschung 5

4.)Aufgabenstellung 9

B.)HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS UND STANDORTBESCHREIBUNGEN 11

Aufgaben,Ziele und Ergebnisse einer botanischen Sammlungsreise nach Griechenland 11

Standortkarte der Digitalis lanata ssp.leucophaea Euböa 16

Standortbeschreibung 17

Standortkarte der Digitalis lanata ssp.leucophaea Athos 18

Standortbeschreibungen 19

C.EXPERIMENTELLER TEIL 21

I.Aufarbeitung des Ausgangsmaterials zum Extrakt 21

II.Säulenchromatographie der Extrakte 22

III.Papierchromatographischer Teil 24

III.PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER TEIL 24
a.)Papierchromatographie der Säulen-
fraktionen 24
b.)Ergebnisse der Papierchromatographie
mit Tabellen und Abbildungen 27
c.)Glykosidkarten zur Papierchromatographie 37

IV.DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER TEIL 40
Allgemeine Beschreibung der Arbeitsweise 40
Liste der Vergleichsglykoside 44
Methoden und Techniken 46
Detektionsmittel 47
Fließmittelbeschreibungen 48
Schematische Darstellungen von DC-Platten
mit verschiedenen Fließmittelsystemen 54
Vergleichende DC-Untersuchung von Säulen-
fraktionen einer Digitalis leucophaea"Euböa" 71
Schematische Darstellung von DC-Platten
mit dem Glykosidmuster der Digitalis leucophae
"Euböa" 75

V.BEURTEILUNG DER METHODE 82
1.)Vorzüge der dünnschichtchromatographischen
Methode 82
2.)Glykosidkarten zur Dünnschichtchromato-
graphie 86
3.)Problematik der dünnschichtchromato-
graphischen Methode 89

VI.Tabelle:Fließmittelsysteme und Rf-Werte 91

VII.Tabelle:Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Untersuchung 95

D.)BEURTEILUNG DER HERKÜNFTE DER UNTERSUCHTEN DIGITALIS LEUCOPHAEA VERTRETER 100

1.)Vergleich der Glykosidmuster der Digitalis leucophaea der ursprünglichen Athosstandorte untereinander 100

2.)Vergleich der Glykosidmuster der Digitalis leucophaea Herkünfte mit dem Glykosidmuster der Digitalis lanata 101

3.)Vergleich der Glykosidmuster der Digitalis leucophaea Herkünfte "Athos" mit dem Glykosidmuster der Digitalis leucophaea Herkunft "Euböa" 103

4.)Schlußbetrachtung zur Taxonomie der Digitalis leucophaea 108

Schlußvergleich der Glykosidmuster der Digitalis leucophaea Herkünfte anhand schematischer Darstellungen des gesamten Glykosidmusters 110

Schlußbemerkung 112

LITERATURVERZEICHNIS 113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

DC- = dünnschichtchromatographische-

PC- = papierchromatographische-

ssp. = subspezies

D.l.A.71 oder D.l.Nr.71 =
Digitalis leucophaea Nr.71
Die Pflanzen wurden im Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen aus Samenmaterial der Digitalis leucophaea vom Berge Athos der Standortnummer 30689-20 kultiviert.

D.l.A.77 oder D.l.Nr.77 =
siehe oben,Standortnummer am Berge Athos:30704-24

SF./Sf. =Säulenfraktion

"CAE" =Fließmittelsystem: Cyclohexan 49
Aceton 49
Eisessig 2

"MÄK/H_2O=Fließmittelsystem: Methyläthylketon
wassergesättigt

Dgg = Digoxigenin
Dtg = Digitoxigenin
Gtg = Gitoxigenin
Gtlg = Gitaloxigenin

A.) EINLEITUNG

1.)Kurze Übersicht über die systematische Gliederung der Gattung Digitalis L.

Zu den bestuntersuchten Arzneipflanzengattungen gehört der Fingerhut und besonders seine beiden wichtigsten Vertreter:Digitalis purpurea und Digitalis lanata.
Aus der Sicht des Botanikers bestehen in Hinsicht auf die systematische Gliederung noch Lücken.Läßt man die strauchartigen Vertreter ausgeklammert,(sie werden unter der Gattung Isoplexis zusammengefaßt und enthalten die in anderen Arten nicht gefundenen Xysmalogenin und Uzarigeninglykoside)so kann man die von K.Werner(1960-1964)vorgeschlagene taxonomische Gliederung annehmen,die neunzehn Spezies aufweist.

Tabelle:Systematische Gliederung der Gattung Digitalis nach WERNER(1978)

SECTIO	SPEZIES	SUBSPEZIES
I. Frutescentes	1.Digitalis obscura	laciniata obscura
II. Digitalis	2.Digitalis thapsi	
	3.Digitalis dubia	
	4.Digitalis heywoodii	
	5.Digitalis mariana	
	6.Digitalis purpurea	
III. Grandiflorae		

Tabelle: Systematische Gliederung der Gattung Digitalis nach Werner

SECTIO	SPEZIES	SUBSPEZIES
III.		
Grandiflorae	7.Digitalis ciliata	
	8.Digitalis davisiana	
	9.Digitalis atlantica	
	10.Digitalis grandiflora	
IV.		
Tubiflorae	11.Digitalis subalpina	
	12.Digitalis lutea	australis
		lutea
	13.Digitalis viridiflora	
	14.Digitalis parviflora	
V.		
Globiflorae	15.Digitalis laevigata	laevigata
		graeca*
	16.Digitalis nervosa	
	17.Digitalis ferruginea	ferruginea
		schischkinii
	18.Digitalis cariensis	lamarckii
		trojana
		cariensis
	19.Digitalis lanata	lanata
		LEUCOPHAEA**

*Zerbst und Bouquet(1974)betrachten sie als eigene Spezies,Digitalis graeca.

**Die hier untersuchte Digitalis leucophaea ist in der taxonomischen Gliederung K.Werners unter 19.Digitalis lanata als Subspezies aufgeführt.

2.) Kurzer historischer Rückblick zur Digitalisforschung.

Seit dem 6.Jahrhundert wurde der Fingerhut in der Volksmedizin eingesetzt.Schon sehr früh ist er in Englischen Pharmakopöen zu finden.So beschreibt LEWIS(1783) in der Londoner Pharmacopoe von 1768 die Anwendung der Fingerhutblätter äußerlich bei scrophulösen Geschwülsten und innerlich bei epileptischen Zuständen.Bis in das 19.Jahrhundert können immer wieder Hinweise auf den pharmazeutischen und medizinischen Einsatz dieser Arzneipflanze verfolgt werden.

Eine Reihe interessanter Details zur Geschichte der Digitalis wurden in einer 1976 erschienenen Publikation von A.Overhamm(Dissertation bei R. Schmitz,Marburg)veröffentlicht.

Die chemische Aufklärung der Wirkstoffe des Fingerhuts begann kurz vor der Jahrhundertwende.Dank der Arbeiten Kellers und Kilianis gelang 1895/1896 ein erster Einblick in die chemische Struktur,hier insbesondere der Zucker.(Richtige Summenformel der Digitoxose)

Von 1915 bis 1935 klärten Windaus,Jakobs und Tschesche im wesentlichen die Struktur der Digitalisglykoside.Bereits 1919 wurde als erstes Standartpräparat "Verodigen"durch Boehringer Mannheim in die Therapie eingeführt.

1933 bis 1935 gelang Stoll und Mitarbeitern die Reindarstellung und Strukturaufklärung der Lanata-und Purpurea-Glykoside.

3.)Kurze Übersicht zur Entwicklungsgeschichte der Untersuchungsmethoden in der Digitalisforschung.

Nach den Aufklärungsarbeiten von Stoll und Mitarbeitern wurden die mengenmäßig wichtigsten Glykoside durch Kombination von Papierchromatographie und Photometrie(Baljet Reaktion;Xanthydrol Reaktion) einzeln und ziemlich genau bestimmt.Dabei wurden ständig neue Glykoside gefunden.
Wieder waren es STOLL und Mitarbeiter (1951), die bereits 1951 Silicagel Säulen zur Trennung von Herzglykosiden benutzten.Sie gaben 1956 die erste umfassende Übersicht aller in der Gattung Digitalis bis dahin gefundener Herzglykoside.

Es folgte zwangsläufig die Kombination von Säulenchromatographie und Papierchromatographie.Hier waren es vor allem Kaiser und Mitarbeiter,die kombinierte analytische Trennungsgänge von Digitalisextrakten an Silicagel Säulen und die Papierchromatographie der Säulenfraktionen beschrieben.

KAISER(1966) sah damals in der alleinigen Anwendung der Dünnschichtchromatographie keinen entscheidenden Vorteil ein Glykosidmuster einer Digitalis Art zu klären, da es nicht möglich war,mit nur je einem Lösungsmittelsystem für die Primär- und Sekundär-Glykoside alle Komponenten eines derart komplexen Gemisches sicher nachzuweisen.Daher beschritt er weiter den Weg, die Bestimmung eines Glykosidmusters durch Kombination von Säulenchromatographie mit Papierchromatographie durchzuführen.

So wurden in den Jahren 1957 bis 1967 weit über 60 Glykoside identifiziert und quantitativ aus dem Extraktmaterial verschiedener Digitalis Arten bestimmt.
Mit Hilfe dieser Methode wurden 1966 neben Digitalis lanata und Digitalis purpurea die quantitativen Glykosidzusammensetzungen der Blätter von Digitalis ferruginea,Digitalis parviflora,Digitalis grandiflora und Digitalis heywoodii bestimmt und das Glykosidmuster in Tabellen erfaßt.

Auch neuere Arbeiten,wie die von IMRE und ERSOY(1978),die das Glykosidmuster der Blätter von Digitalis schischkinii abklären, bauen auf dieser bewährten Methode auf.

Die steigende Zahl bekannter Digitalisglykoside vergrößerte die Anforderungen an die Analytik und bedingte den Einsatz von Säulenchromatographie,Papierchromatographie oder Dünnschichtchromatographie in Kombination mit Photometrie oder Fluorimetrie.

Etwa seit 1975 wurde die Herzglykosidanalytik wesentlich bereichert durch den Einsatz der HPTLC(high performance thin layer chromatography).Diese Methode ist gerade für die Trennung von relativ polaren,thermolabilen Stoffen hervorragend geeignet.Sie wird zum Beispiel von KARTNIG und KOBOSIL(1977) bei der Trennung der Cardenolide aus Digitalis lanata und Digitalis purpurea eingesetzt. Allerdings erlaubt die HPTLC derzeit noch keine Gesamtanalyse in einem einzigen Arbeitsgang.
Zukünftig wird man auch der HPLC (high performance liquid chromatography) Beobachtung schenken müssen.

Hierbei(HPLC)werden Säulen verwendet,die man unter Druck betreibt.Bis zu 600bar kann der Druck betragen,mit dem das Lösungsmittelgemisch durch die gepackte Säule gepresst wird. Analysen,zu denen man früher Tage benötigte, liefert die HPLC in Minuten oder Sekunden. (REINHOLZ/ZAHN 1978)

Die Direktauswertung in der Dünnschichtchromatographie,besonders mittels Fluorimetrie bei der Serienanalyse von Spezialpräparaten bereits bewährt,kam verschiedentlich zur Anwendung.NOVER(1969)
Ihre Anwendbarkeit für eine Gesamtanalyse wird von WICHTL(1978)bezweifelt.Allerdings wurde diese Methode zu solchen Zwecken noch nicht eingesetzt.

Die Beschäftigung mit den zahlreichen Arbeiten von Kaiser zur Klärung der Inhaltsstoffe verschiedener Digitalis Arten führte dazu,den Versuch einer Gesamtanalyse zu machen,wobei die Möglichkeit untersucht werden muß,ob Kaisers klassische Methode:"Kombination von Säulenchromatographie mit Papierchromatographie" nicht umstellbar ist auf säulenchromatographische Trennung und nachfolgende dünnschichtchromatographische Untersuchung der Säulenfraktionen.

Dabei stand die Überlegung im Vordergrund,daß es möglich sein müßte,die aufwendige Papierchromatographie(sie bedingt zum Beispiel große Gefäße,große Mengen Fließmittel und ist sehr zeitaufwendig) durch die vorteilhafter erscheinende Dünnschichtchromatographie zu ersetzen. Auch ist seit den 60er Jahren die Papierchromatographie mehr und mehr in den Hintergrund gedrängt worden,dagegen fand auf dem Gebiet

der Dünnschichtchromatographie eine ständige Weiterentwicklung statt,wie schon die Fülle neuer dünnschichtchromatographischer Methoden, die Verbesserung des Arbeitsmaterials und das vielfältige Angebot an Hilfsgeräten zeigen.

4.)Aufgabenstellung:

Aus den vorangegangenen Betrachtungen ergaben sich bereits die Ziele der Aufgabenstellung.

a.)Es sollte der Versuch gemacht werden,die klassische Untersuchungsmethode,die Kaiser entwickelte und bei der die Klärung eines Glykosidmusters einer Digitalis Art durch die Kombination von Säulenchromatographie und Papierchromatographie erfolgt,umzustellen auf eine Kombination von Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie.Dadurch müßte der Arbeitsaufwand einer Gesamtanalyse wesentlich verringert werden.Eine intensive dünnschichtchromatographische Untersuchung der Säulenfraktionen sollte zeigen,ob diese Umstellung möglich ist.

Damit die Vorteile oder Möglichkeiten der Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie besser abgewägt und beurteilt werden können,wurden die Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea zweier Standorte zusätzlich auch papierchromatographisch untersucht.So wurde erreicht,daß beide Methoden verglichen werden konnten.Zum anderen wurde ermöglicht,die erhaltenen Ergebnisse den Tabellen zuzuordnen,in denen die Ergebnisse der nach der klassischen Methode untersuchten Digitalis Arten enthalten sind.

b.)Von Digitalis lanata subspezies leucophaea lagen keine Untersuchungen des gesamten Glykosidmusters vor.Daher sollte das Glykosidspektrum dieser Subspezies erstellt werden. Die Ergebnisse sollten klären helfen,ob sich bei den untersuchten Digitalis Herkünften neben morphologischen Unterscheidungsmerkmalen eindeutige chemische Unterschiede finden

lassen,anhand derer die taxonomische Umstellung der Digitalis leucophaea möglich würde,wie sie von Zerbst und Bouquet vorgeschlagen war.

c.)Aufbau des experimentellen Teils:

Nachfolgend wird die Trennung des Blattextraktes zweier Digitalis leucophaea Pflanzen an der Kieselgelsäule beschrieben.

Das untersuchte Blattmaterial stammte von kultivierten Pflanzen.Diese lassen sich auf zwei verschiedene ursprüngliche Standorte am Berge Athos in Griechenland zurückführen. (siehe Teil B,Herkunft)

Die einzelnen Säulenfraktionen wurden dann zunächst papierchromatographisch untersucht.

Auf die Papierchromatographie folgte die dünnschichtchromatographische Trennung und Bestimmung der Glykoside.

Daran schließt sich eine nur dünnschicht-chromatographische Untersuchung einer Digitalis leucophaea an.Der ursprüngliche Standort dieser Pflanze war auf der Insel Euböa in Griechenland.Die Säulenfraktionen des Blatt-extraktes dieser Herkunft wurden von Herrn Dr.Kaiser,Boehringer Mannheim,zur Verfügung gestellt.
Die Ergebnisse der Untersuchung der drei Vertreter der Digitalis leucophaea unterschiedlicher Standorte wurden vergleichend gegenübergestellt.

Da durch diese Einteilung des Arbeitsganges der Bezug zu den Arbeiten von Kaiser hergestellt war,konnten die erhaltenen Ergebnisse mit denen der bereits untersuchten Digitalis Arten verglichen werden,und die Zuordnung der Digitalis leucophaea wurde möglich.

B.) HERKUNFT DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS UND STANDORTBESCHREIBUNGEN.

Das von mir untersuchte Blattmaterial stammt aus dem Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen.

Dort wurde im Arzneipflanzengarten die Digitalis leucophaea aus Samenmaterial kultiviert, das von ZERBST(1973) anläßlich einer botanischen Sammlungsreise nach Griechenland im Jahre 1973 mitgebracht worden war.
Zerbst führte im Jahre 1973 für den Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen diese Sammlungsreise durch.Sie erfolgte unter dem Hauptgesichtspunkt der Beschaffung von Kultivierungsmaterial der Gattung Digitalis. Sammlungszeitraum war der 29.Juli bis 12.September 1973.

I.Ziele der Reise:
Unter anderem bestanden folgende Ziele:
a.)Beschaffung von Material zur Kultivierung von Digitalis lanata ssp.lanata und ssp.leucophaea.

b.)Aufklärung über Vorkommen und ökologische Bedingungen der Digitalis lanata ssp.leucophaea.

c.)Neue Erkenntnisse der Standortökologie der Gruppe Digitalis lanata.

d.)Feststellung der Südgrenze des Verbreitungsgebietes der Gruppe Digitalis lanata.

II. Ergebnisse der Reise:

Unter anderem erbrachte die Reise folgende Ergebnisse:

a.)Von Digitalis lanata ssp.lanata und ssp. leucophaea wurden 31 Populationen voll bearbeitet,das heißt:Sammlung von Samen,Konservierung von Infloreszenzen und Blättern, Dokumentation des Standortes durch Skizzen und Fotografien sowie Entnahme von Bodenproben.

b.)Digitalis lanata ssp.leucophaea wurde auf der Insel EVIA(=Euböa) und auf der Halbinsel AGION OROS(=Athos)gesammelt.Diese Art wurde wesentlich häufiger angetroffen als ursprünglich erwartet.Eine spätere taxonomische Bearbeitung wurde beabsichtigt.

c.)Es war zu vermuten,daß Digitalis lanata ssp.lanata die bei weitem größte ökologische Amplitude innerhalb der Vertreter der Gattung aufweist.Diesbezüglich sollten für Nord-Griechenland Rassen dreier Gebiete unterschieden werden:

1.Bergrassen(600) 700-1200m
2.Rassen des Hügel-und Flachlandes
3.Rassen,die im direkten Einflußbereich des Meeres(50 bis 300 m vom Strand) wachsen.

d.)Als Südgrenze für Digitalis lanata ssp. lanata wurde PREVEZA,für Digitalis lanata ssp.leucophaea EVIA(Euböa) festgestellt.

III.Gebietsschwerpunkt:

Als Gebietsschwerpunkt der Reise wurden einer genauen Bearbeitung durch Begehung zwei Gebiete unterzogen,in denen Digitalis lanata ssp.lanata (ZAGORIA,20km^2) und Digitalis lanata ssp.leucophaea(AGION OROS,20km^2) in geschlossenen Beständen vorkommen.

IV.Standorte:

Der Bericht der botanischen Sammlungsreise enthält nachfolgende Übersichtskarte,in der die Standorte von Digitalis lanata ssp.lanata und Digitalis lanata ssp.leucophaea aufgezeigt sind.Die laufenden Nummern 1 bis 31 beziehen sich auf die von Zerbst erstellte Pflanzenliste.

V.Pflanzenliste:

ssp.Name	Sammel-Nr.	lfd. Nr.	Herkunft
lanata	30.507	1	Paramithia(Kokitos)
"	520	2	Soulopoulon(Thiamis)
"	531	3	Asprangeli(Zagoria)
"	553	4	Kipi(Zagoria)
"	567	5	Skamnellion(Zagoria)
"	578	6	Bitsa(Zagoria)
"	586	7	Nea Sampsous(Prevezza)
"	591	8	Nikopolis(Prevezza)
leucophaea	30.614	9	Prokopion(Euböa)westlich
*LEUCOPHAEA	30.625*	10	PROKOPION(EUBÖA)östlich
lanata	30.658	11	Kala Nera(Pilion)
"	670	12	Stomion(Ossa)
"	672	13	Ag.Nikolaos(Sithonia)
"	673	14	Kassandria(Kassandra)

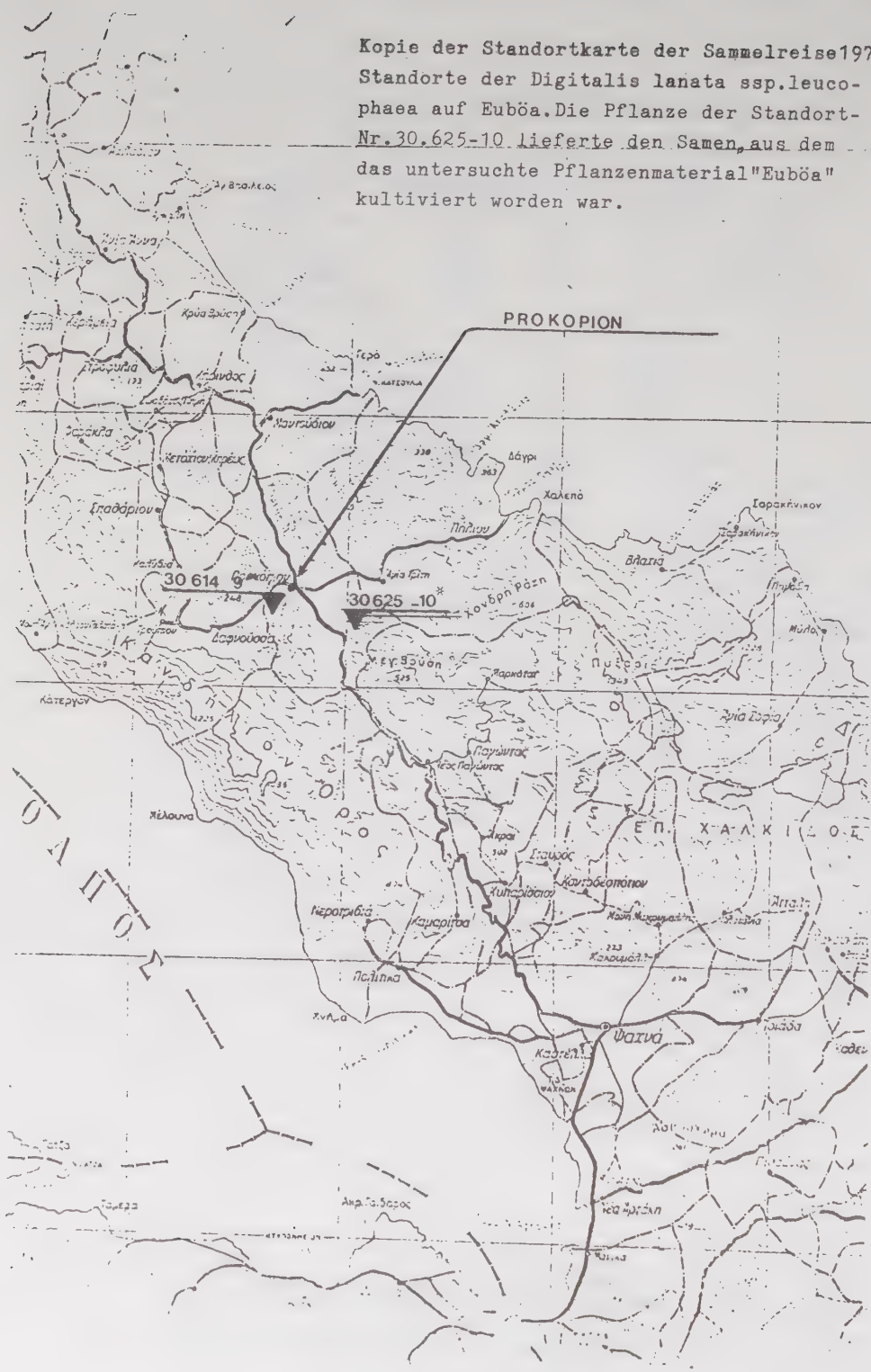
Pflanzenliste:

ssp.Name	Sammel Nr.	lfd. Nr.	Herkunft
lanata	30.675	15	Saloniki(Kissos)
"	680	16	Chlomion(700 m)
"	682	17	Chlomion(900 m)
leucophaea	687	18	Athos(Koutloumousion)
"	688	19	Athos(Karies)
*LEUCOPHAEA	30.689 *	20	ATHOS(IVIRON)
"	690	21	Athos(Philotheou)
"	697	22	Athos(50 m)
"	701	23	Athos(500 m)
*LEUCOPHAEA	30.704*	24	ATHOS(KAPSOKALIVIA)
leucophaea	716	25	Athos(Kerasia)
lanata	723	26	Stratonion(Chalkidiki)
"	724	27	Kavala
"	725	28	Pangaeon
"	728	29	Xanthi
"	730	30	Volax
"	733	31	Dorkas(Lagadas)

Die in der Pflanzenliste durch SCHRIFT und * gekennzeichneten und auf den Standortkarten unterstrichenen Pflanzen lieferten den Samen, aus dem in Tübingen das untersuchte Pflanzenmaterial kultiviert wurde.

Übersichtskarte Griechenland 1:3.000.000

▲ = Standorte der Digitalis lanata ssp.lanata und ssp.leucophaea(9+10;18-25)mit laufender Nummern der Pflanzenliste von Zerbst.



Kopie der Standortkarte der Sammelreise 1973. Standorte der Digitalis lanata ssp. leucophaea auf Euböa. Die Pflanze der Standort-Nr. 30.625-10 lieferte den Samen, aus dem das untersuchte Pflanzenmaterial "Euböa" kultiviert worden war.

Standortbeschreibung von Digitalis lanata ssp.leucophaea der Sammelnummer 30.625-10 (ZERBST 1973)

Aus dem mitgebrachten Samen wurden im Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen Pflanzen kultiviert.Der Blattextrakt dieser Pflanzen wurde von Kaiser(Fa.Boehringer-Mannheim) säulenchromatographisch getrennt. Die Säulenfraktionen wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt und für eine vergleichende Untersuchung dünnschichtchromatographisch durchmustert.(s.S.71)

STANDORTBESCHREIBUNG:

Pflanze Nr.30.625-10

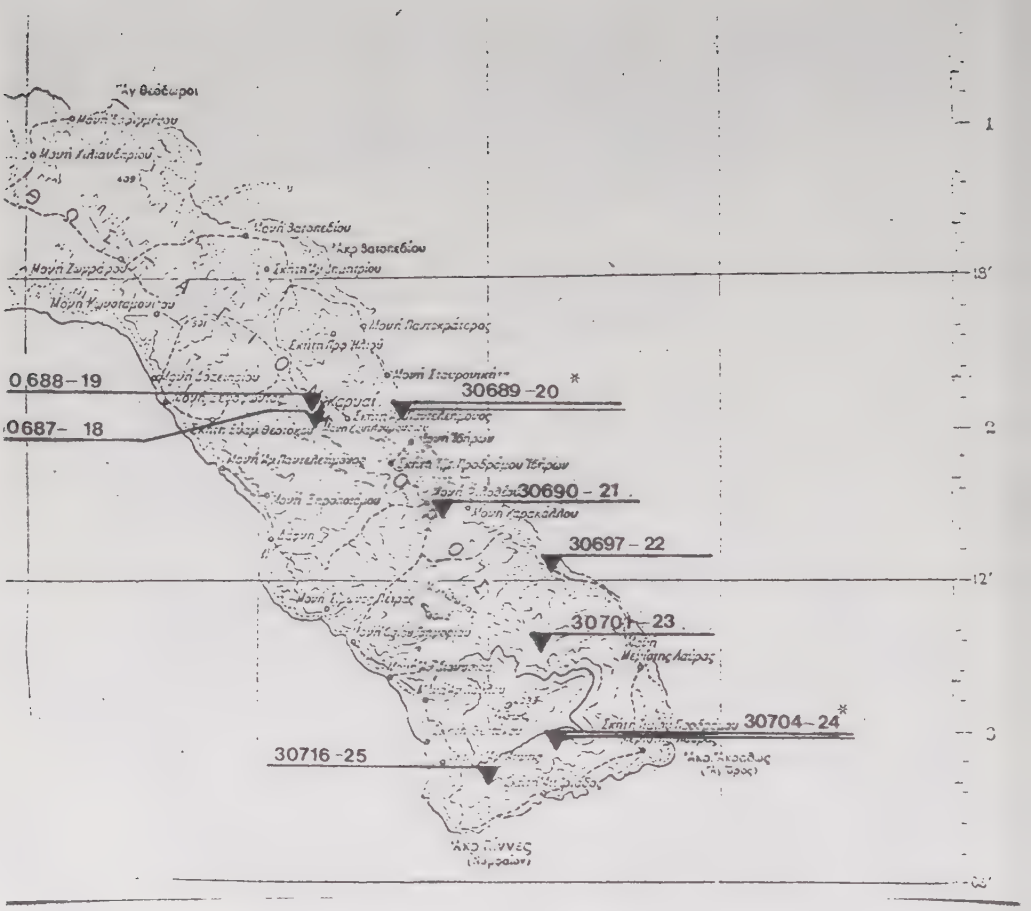
Karte:KARTA NOMOS 1:200.000 (1cm=2km)

Ort:Östlich PROKOPION am Fahrweg der von der Hauptstraße zum Steinbruch führt,NOMOS EVIAS

Höhe: 100m

Material:Exsiccata,Rosetten,Samen

Standort:Verbreitet im Halbschatten von Pinus und Maccia-Vertretern
sehr kräftige Exemplare
80cm bis 1,50m hoch
Samen sehr reif
Der Fluß in der Nähe führt Wasser!
Terra rossa!



Kopie der Standortkarte der Sammelreise 1973. Standorte der Digitalis lanata ssp.leucophaea auf der Halbinsel ATHOS.Die Pflanzen der Sammelnummern 30.689-20 und 30.704-24 lieferten den Samen, aus dem das untersuchte Pflanzenmaterial "Athos D.l.A71 und D.l.A.77"kultiviert worden war.

Standortbeschreibung von Digitalis lanata ssp.leucophaea der Sammelnummern 30.689-20 und 30.704-24 (ZERBST 1973)

Aus dem mitgebrachten Samen dieser Pflanzen wurden im Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen das in dieser Arbeit untersuchte Pflanzenmaterial kultiviert. Die Blätter der Pflanzen wurden zum Extrakt verarbeitet und der Blattextrakt säulenchromatographisch getrennt. Die Säulenfraktionen wurden sowohl papierchromatographisch als auch dünnschichtchromatographisch durchmustert.

STANDORTBESCHREIBUNG:

Pflanze Nr.30.689-20 6.9.1973

Ort: 2km nördlich des Klosters IVIRON
Agion Oros,NOMOS CHALKIDIKIS

Höhe:100m

Material:Exsiccata,Samen

Standort:In der Maccia,sehr trocken,im Einflußbereich des Meeres(400m),dicht gedrängte Population,etwa 30 Exemplare,1m bis 1,5m hoch, sehr reife Samen,Stengelteile abgestorben, Rosetten vorhanden

Auf diesen ursprünglichen Standort lassen sich die Pflanzen der Untersuchungsnummer 71 zurückführen.

STANDORTBESCHREIBUNG:

Pflanze Nr.30.704-24 8.9.1973

Ort:An den Südquellen des Athos-Gipfels
Agion Oros,NOMOS CHALKIDIKIS

Höhe:800m

Material:Exsiccata,Samen

Standort:Im Schatten von Abies,Mischwald,
feuchter und montaner Standort,
kräftige Exemplare,1m bis 1,4m
hoch,keine Blüten,Samen reif

Auf diesen ursprünglichen Standort lassen sich die Pflanzen der Untersuchungsnummer 77 zurückführen.

C.) EXPERIMENTELLER TEIL

Um den Bezug zu den Arbeiten von Kaiser zu sichern, wurde dessen klassische Methodik der Untersuchung von Digitalisextrakten bei den Pflanzen nachvollzogen, die aus dem Samenmaterial der Athos Standorte kultiviert worden waren.
Auf die Aufbereitung des Blattmaterials zum Extrakt folgte die säulenchromatographische Trennung und anschließende papierchromatographische Untersuchung der Säulenfraktionen.
Der Nachvollzug der Papierchromatographie ermöglichte den Vergleich der Methoden und gestattete, die erhaltenen Ergebnisse für den Vergleich zu reproduzieren.
Nach der Papierchromatographie wurden die Säulenfraktionen dünnschichtchromatographisch durchmustert. Dünnschichtchromatographisch untersucht wurden zusätzlich noch Säulenfraktionen einer Digitalis leucophaea, deren ursprünglicher Standort auf der Insel Euböa zu finden war.

I.)AUFARBEITUNG DES AUSGANGSMATERIALS ZUM EXTRAKT.

Das Blattmaterial zweier Digitalis leucophaea Pflanzen wurde vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.
Das Blattmaterial aus dem Arzneipflanzengarten trug die Nummern 71 und 77. Die Blätter der Nr.71 stammen von Pflanzen, die aus dem Samen der Digitalis leucophaea mit der Standortnummer 30.689-20 kultiviert worden waren. Die Blätter der Nr.77 stammen von Pflanzen, die aus dem Samen der Population der Standortnummer 30.704-24 kultiviert worden waren. Beide Samen entstammten Fundorten am Berge Athos.
Während der Untersuchung und für die Darstellungen und Tabellen wurden die Bezeichnungen Nr.71 und Nr.77 beibehalten.

Die Blätter befanden sich in gut getrocknetem Zustand und wurden bis zur raschen Aufarbeitung bei ca.15°C kühl und trocken gelagert.
Von Nr.71 standen 778g und von Nr.77 1014g zur Verfügung.

Die Aufarbeitung zum Extrakt erfolgte genau nach der bei KAISER(1966) beschriebenen Methode.

300g der Blätter Nr.71 ergaben 11g Trockenextrakt.(=3,6% Ausbeute)
250g der Blätter Nr.77 ergaben 10,2 g Trockenextrakt.(=4% Ausbeute)

II.SÄULENCHROMATOGRAPHIE DER EXTRAKTE

Die Trennung erfolgte an Kieselgel 100 Merck. (Artikel Nr.10184,70-230mesch ASTM für Säulen)

Es wurden 55cm hohe Glassäulen(mit Hahn) benutzt,sie hatten den Durchmesser von 5cm.

10g des Trockenextraktes wurden mit 60g trockenem Kieselgel(=1/5tel der eingesetzten Menge)sorgfältig verrieben,danach wurde die erforderliche Menge Wasser zugesetzt(Kieselgel/Wasser 1:1)und zur Homogenität gemischt. Das auf eine Saugflasche gestellte Chromatographierohr war mit dem restlichen 4/5tel des mit Wasser entaktivierten Kieselgel ohne Zusatz von Lösungsmittel gefüllt.Hierauf wurde das mit Extrakt vermischte Kieselgel aufgegeben.Die Füllhöhe betrug jetzt 40cm.Nach Aufgeben des ersten Extraktionsmittels und Anlegen eines leichten Vakuums setzte sich die Füllung auf 33cm.
Der weitere Trennungsgang an der mit 10g Extrakt beschickten Säule und die Aufarbeitung zu 23 Säulenfraktionen folgte wieder der Methode nach Kaiser.

Der Trockenrückstand der einzelnen Säulenfraktionen wurde gewogen und mit Methanol: Chloroform 1:1 im Meßkolben zu 5ml versetzt. Die Aufbewahrung erfolgte im Gefrierschrank bei -30°C.

Für die einzelnen Säulenfraktionen wird der Trockenrückstand in mg angegeben, wobei die Fraktionen Nr.1 und Nr.2 hauptsächlich Ballaststoffe enthielten und im weiteren Verlauf der Untersuchung unberücksichtigt blieben.

Trockenrückstand der Säulenfraktionen in mg:

Säulenfraktion Nr.	Digitalis leucophaea Nr.71	Digitalis leucophaea Nr.77
1	968,5	377,1
2	63,1	57,0
3	480,4	244,8
4	106,0	89,4
5	63,3	68,5
6	112,1	78,5
7	106,7	61,5
8	112,4	44,0
9	327,9	87,6
10	194,4	136,2
11	341,9	165,7
12	473,5	367,2
13	304,2	286,5
14	233,4	135,0
15	179,4	118,3
16	279,4	152,3
17	124,7	189,8
18	157,0	88,5
19	232,9	330,4
20	226,2	230,5
21	460,2	580,3
22	294,4	370,4
23	456,4	447,0
	=56,3%	=47% des Extraktes

III.)PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER TEIL.

a.)Papierchromatographische Untersuchung der Säulenfraktionen.

Die einzelnen Säulenfraktionen wurden papierchromatographisch untersucht.

MATERIAL:
Verwendet wurde eine Glaskammer,speziell für die Papierchromatographie angefertigt und versehen mit Vorrichtungen für die aufsteigende und absteigende Methode der Papierchromatographie.
Eine Beschreibung der Kammer findet sich bei WICHTL(1971).
Die Kammer war 60cm hoch und hatte den Durchmesser von 22cm.Kammer und Zusatzvorrichtungen wurden eigens angefertigt von K.SCHLEE -Glasinstrumententechnik GmbH,5810 Witten,Wasserbank 3-.Die Anfertigung erfolgte,da es sich als unmöglich erwies,eine für die Papierchromatographie geeignete,genügend große Kammer im freien Handel zu erwerben.

Es wurde Papier der Marke SELECTA 2043/Mgl der Firma Schleicher und Schüll,Einbek,verwendet.
Das Papier wurde in Laufrichtung zu 20cm breiten Streifen geschnitten.Die Startflecke wurden in der Regel im Abstand 3cm vom Rand und 2,5cm untereinander markiert.

Teilweise wurde das Papier mit einer 20% Formamidlösung in Aceton imprägniert.Nachdem zwischen mehreren Lagen aus reinem,glatten Filtrierpapier abgepresst wurde,begann alsbald das Auftragen der Fraktions-und Vergleichsproben. Um ein Auswaschen der Imprägnierung an den Startpunkten zu vermeiden,wurde auf diese direkt vor dem Auftragen mit einer Mikropipette 5µl der Formamid-Acetonlösung aufgegeben.

AUFTRAGEN DER SÄULENFRAKTIONS- UND VERGLEICHS-LÖSUNGEN:

2-20µl wurden punktförmig mit 1µl,2µl und 5µl Pipetten (Microcaps Drummond) aufgetragen.

FLIESSMITTEL:

1.)Xylol:Methyläthylketon
1:1
für die Säulenfraktionen 3 bis 10,die hauptsächlich Sekundärglykoside enthalten.

2.)Chloroform:Tetrahydrofuran:Formamid
50:50:6,5
Formamid imprägniertes Papier
für die Säulenfraktionen 8 bis 16 nach der aufsteigenden Methode der Papierchromatographie.

3.)Chloroform:Tetrahydrofuran:Formamid
50:50:4,5
Formamid imprägniertes Papier
für die Säulenfraktionen 16 bis 23 nach der absteigenden Methode der Papierchromatographie.

Die Wahl der Fließmittel und der Methode bei der Papierchromatographie folgte streng der Methode,die KAISER(1963) anwendete,mit dem Ziel eine optimale Reproduzierbarkeit zu erreichen.So wurde ein späteres Einordnen der Ergebnisse zu den von Kaiser in seinen Arbeiten erstellten Glykosidkarten möglich.

Nach der Entwicklung,die etwa 12 Stunden für ein Papierchromatogramm erforderte,wurden die Papierchromatogramme im Trockenschrank 20 Minuten bei 120°C getrocknet,bis vor allem das Formamid entfernt war.

DETEKTION:

Es wurde Trichloressigsäure-Chloramin T-Reagenz verwendet, wobei 15 Volumenteile einer 25%igen Trichloressigsäure in Äthanol 99% und ein Volumenteil einer 5%igen wässrigen Chloramin T Lösung jeweils frisch gemischt wurden.
JENSEN(1953) und KAISER(1955) schlugen dieses Reagenz vor,da es mit Steroiden unter Bildung von Fluoreszenzfarben reagiert,die eine Unterscheidung der Glykoside ermöglichen.
Es reagierten mit den Fluoreszenzfarben:

gelb: A-Glykoside

grün
grüngelb: B-Glykoside

blau
stahlblau: C-Glykoside

AUSWERTUNG:

die Auswertung erfolgte am Desaga-UVIS, Universalgerät für UV 254nm + 366nm.
Anhand der in Konzentrationsreihen von 2-20µl mitgelaufenen Lösungen der Vergleichsglykoside wurde der Glykosidgehalt der Säulenfraktionen quantitativ abgeschätzt.

Mit Hilfe des am Desaga-UVIS befindlichen Photostativs wurde der Versuch gemacht,mit einer aufgeschraubten Spiegelreflexkamera die Papierchromatogramme auf Negativfilm zu dokumentieren.Bedingt durch das Format der Papierchromatogramme erwies sich der Versuch als unzureichend,so daß auf eine Wiedergabe verzichtet wurde.Dünnschichtchromatographische Platten ließen sich an diesem Gerät gut auf Kodaccolor II/C135/21 DIN Negativfilm auch unter UV-Licht beider Wellenlängen photographisch festhalten.Es wurden viele Platten bei Blende 8 mit Zeitautomatik(etwa 1/30sec)dokumentiert.

b.)Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchung der Digitalis leucophaea mit Tabellen und Abbildungen.

Die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchung wurden für die einzelnen Säulenfraktionen und Fließmittelsysteme in Tabellen erfasst.
Die Rf-Werte der gefundenen Glykoside wurden beim jeweiligen Fließmittel angegeben und die Ergebnisse in Analogie zu Kaiser in Glykosidkarten dargestellt.

Beim Auftreten von Schwierigkeiten bei der Identifizierung einiger Glykoside in einzelnen Säulenfraktionen könnte wie bei KAISER (1966) nach den in der Herzglykosidchemie üblichen Methoden verfahren werden.
Literatur auch:KUTTER/FAUCONNET(1959)
SCHMUTZ/REICHSTEIN(1947)
MANNICH/SIEWERT(1942)
Neben den dort beschriebenen Methoden wurde mit Hilfe der DC-Methode(Teil C;IV)zusätzliche Aufklärungsarbeit möglich.So ließ sich zum Beispiel das von Kaiser für die Papierchromatographie verwendete Fließmittelsystem 6:

Äthylacetat 90
Äthanol 10
Wasser 5
Wasser/Aceton(2:3)imprägniertes Papier

sehr gut auf die Dünnschichtchromatographie übertragen.Es half in den späten Säulenfraktionen die Anwesenheit der Glykoside Neo-odorobiosid G (Nr.22) neben Odorobiosid G (Nr.21) und Glucodigifucosid(Nr.27) zu prüfen oder den Nachweis von Neo-digitalinum verum(Nr.24) neben Digitalinum verum(Nr.23) zu erbringen.

Die Nummern der Vergleichsglykoside entsprechen denen der Kaiser Literatur zu Digitalis Untersuchungen und wurden im experimentellen Teil und in den Tabellen beibehalten,um den Vergleich zu ermöglichen.

Für die qualitative Auswertung erwiesen sich die von Kaiser erarbeiteten "Karten" im Vergleich mit den erhaltenen Fraktionschromatogrammen als sehr gut geeignet.So konnte in einzelnen Fällen,in denen keine Vergleichsglykoside zur Verfügung standen wie beim Lanatosid E(6),Neo-gluco-verodoxin(26) oder Digiprosid(62),die Identifizierung anhand der Fluoreszenzfarben und der Rf-Werte dort erfolgen.

Die Säulenfraktionen 16 bis 23 wurden zusätzlich nach der absteigenden Methode der Papierchromatographie durchmustert.Durch diese Methode wurde in den späten Fraktionen eine bessere Trennung der Glykoside und damit deutlicher unterschiedene Rf-Werte erhalten.

Von allen Säulenfraktionen 3 bis 23 wurden nach den aufgeführten Methoden bis zu 10 Papierchromatogramme angefertigt.Die in den Abbildungen 1 bis 4 und in den Tabellen zu diesen Abbildungen angegebenen Werte wurden aus dem Durchschnitt der Einzelergebnisse gemittelt.

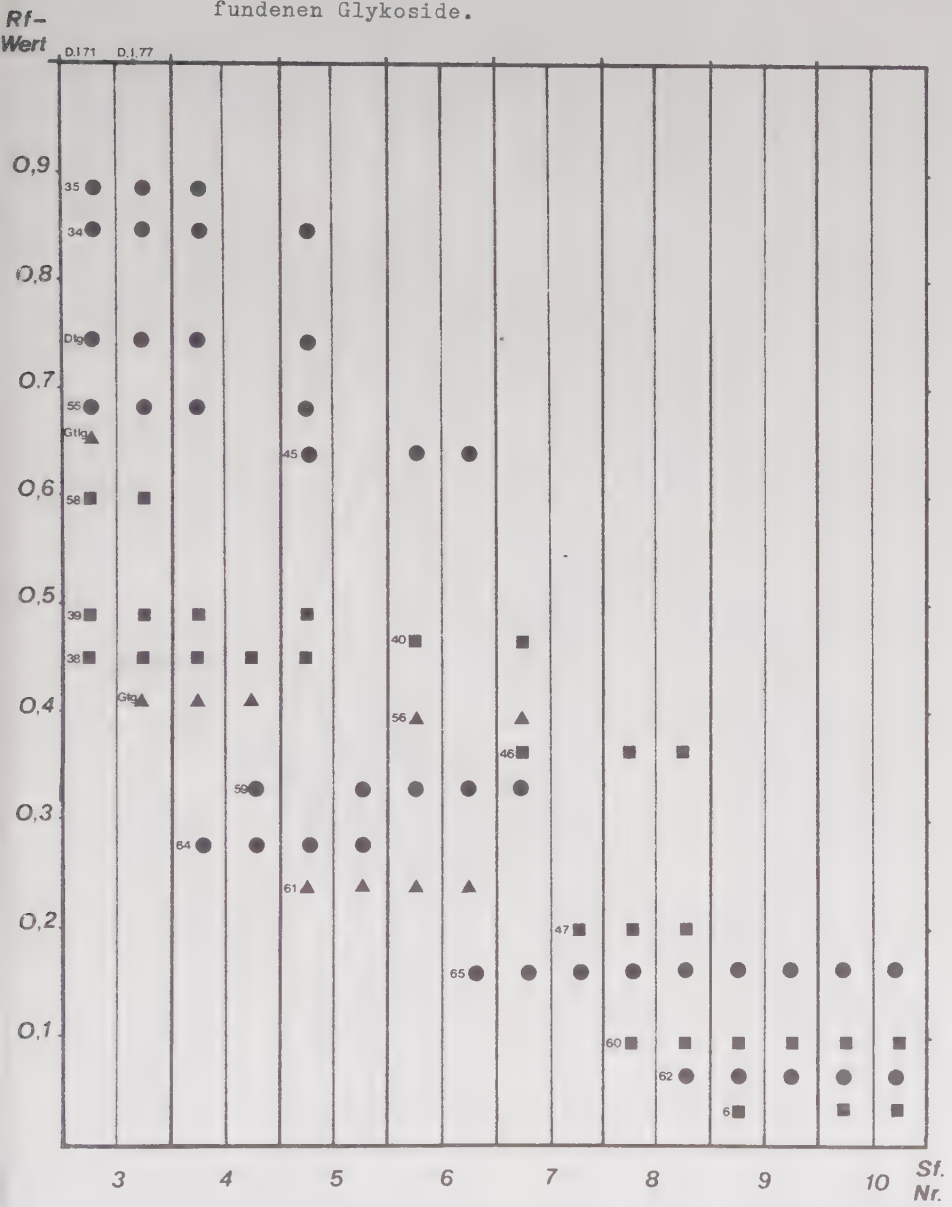
Die Abbildungen erfolgen schematisch.Die Glykoside werden nach qualitativem Befund mit ihrem Rf-Wert beim jeweiligen Fließmittelsystem wiedergegeben. Für die Darstellung der Glykoside werden folgende Symbole verwendet:

● =A-Glykoside

▲ =B-Glykoside

■ =C-Glykoside

Abbildung 1: Papierchromatographie der Säulenfraktionen 3 bis 10 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77. Die Abbildung zeigt die in der jeweiligen Fraktion gefundenen Glykoside.



Unter der Nr. der Säulenfraktion sind in der ersten Spalte die Glykoside der Digitalis leucophaea Nr.71, in der zweiten Spalte die der Nr.77 angegeben. Die Nummern der Glykoside entsprechen denen der nachgestellten Tabellen und der Bezeichnung bei Kaiser.

●=Glykoside des A-Typs ▲=Glykoside des B-Typs
■=Glykoside des C-Typs

Tabelle zur Abbildung 1:
Papierchromatographie der Säulenfraktionen 3 bis 10 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77.

FLIESSMITTEL: Xylol 1
Methyläthylketon 1

IMPRÄGNIERUNG: Formamid

METHODE: aufsteigende Papierchromatographie

TEMPERATUR: 20°C beim Auftragen und im Chromatograpieraum

LAUFZEIT: 10 Stunden

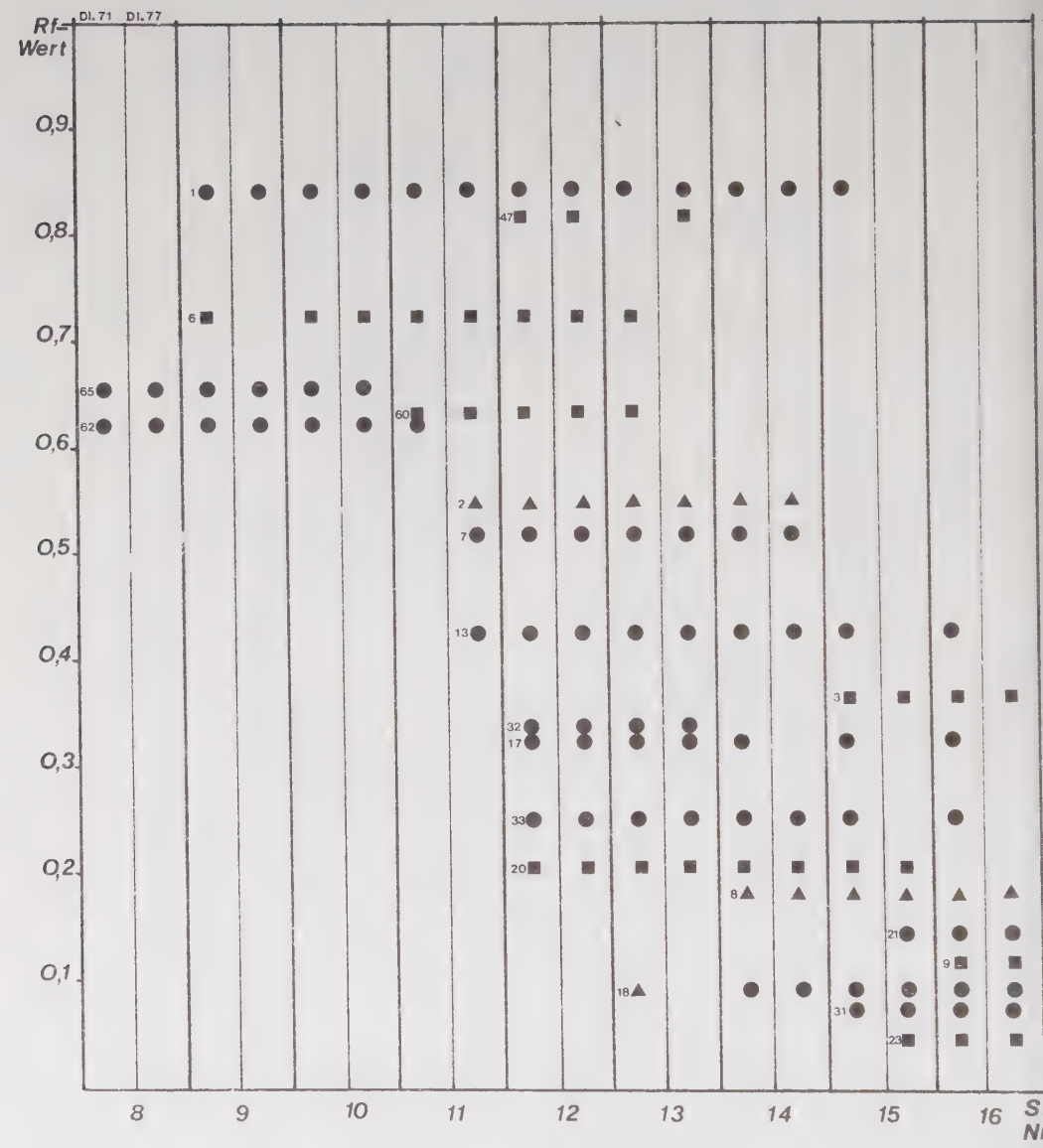
FRONT: 30cm

Rf-Wert	Fluoreszenz-farbe	Glykosid Nr.	Name des Glykosids	Vor-kommen Sf.Nr.
0,89	gelb	35	βAcetyldigitoxin	3/4
0,85	gelb	34	αAcetyldigitoxin	3/4/5
0,76	blau	43	αAcetylgitaloxin	
0,75	gelb	Dtg	Digitoxigenin	3/4/5
0,68	gelb	55	Evatromonosid	3/4/5
0,66	grün	Gtlg	Gitaloxigenin	3
0,64	gelb	45	Digitoxin	5/6
0,59	stahlblau	58	Lanadoxin	3
0,56	blau	36	αAcetylgitoxin	
0,54	grün	50	Gitaloxin	
0,49	blau	39	βAcetyldigoxin	3/4/5
0,45	blau	38/40	α/γ Acetyldigoxin	3-5/6-7
0,40	grün	Gtg	Gitoxigenin	3/4
0,39	grün	56	Gitorosid	6/7
0,33	blau	46	Gitoxin	7/8
,32	gelb	59	Odorosid H	5/6
0,27	gelb	64	Digitoxigenin-allo-methylosid	4/5

Fortsetzung der Tabelle zur Abbildung 1:

Rf-Wert	Fluoreszenz-farbe	Glykosid Nr.	Name des Glykosids	Vor-kommen Sf.Nr.
0,26	blau	Dgg	Digoxigenin	-
0,25	blau	57	Digoxigenin-digitoxosid	-
0,21	blaugrün	61	Verodoxin	5/6
0,20	blau	47	Digoxin	7/8
0,19	blau	53	Digoxigenin-bis-digitoxosid	-
0,15	gelb	65	Digitoxigenin-glucomethylosid	6-10
0,09	blau	48	Neodigoxin	-
0,09	grünblau	60	Strospesid	8-10
0,07	gelb	62	Digiprosid	8-10
0,06	blau	49	Diginatin	-

Abbildung 2:Papierchromatographie der Säulenfraktionen 8 bis 16 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77.Die Abbildung zeigt die in den jeweiligen Säulenfraktionen gefundenen Glykoside.



● = Glykoside des A-Typs

▲ = Glykoside des B-Typs

■ = Glykoside des C-Typs

Tabelle zur Abbildung 2:
Papierchromatographie der Säulenfraktionen
8 bis 16 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77

FLIESSMITTEL: Chloroform 50
Tetrahydrofuran 50
Formamid 6,5

IMPRÄGNIERUNG: Formamid

METHODE: aufsteigende Papierchromatographie

TEMPERATUR: 20°C beim Auftragen und im Chromatographieraum

LAUFZEIT: 12 Stunden

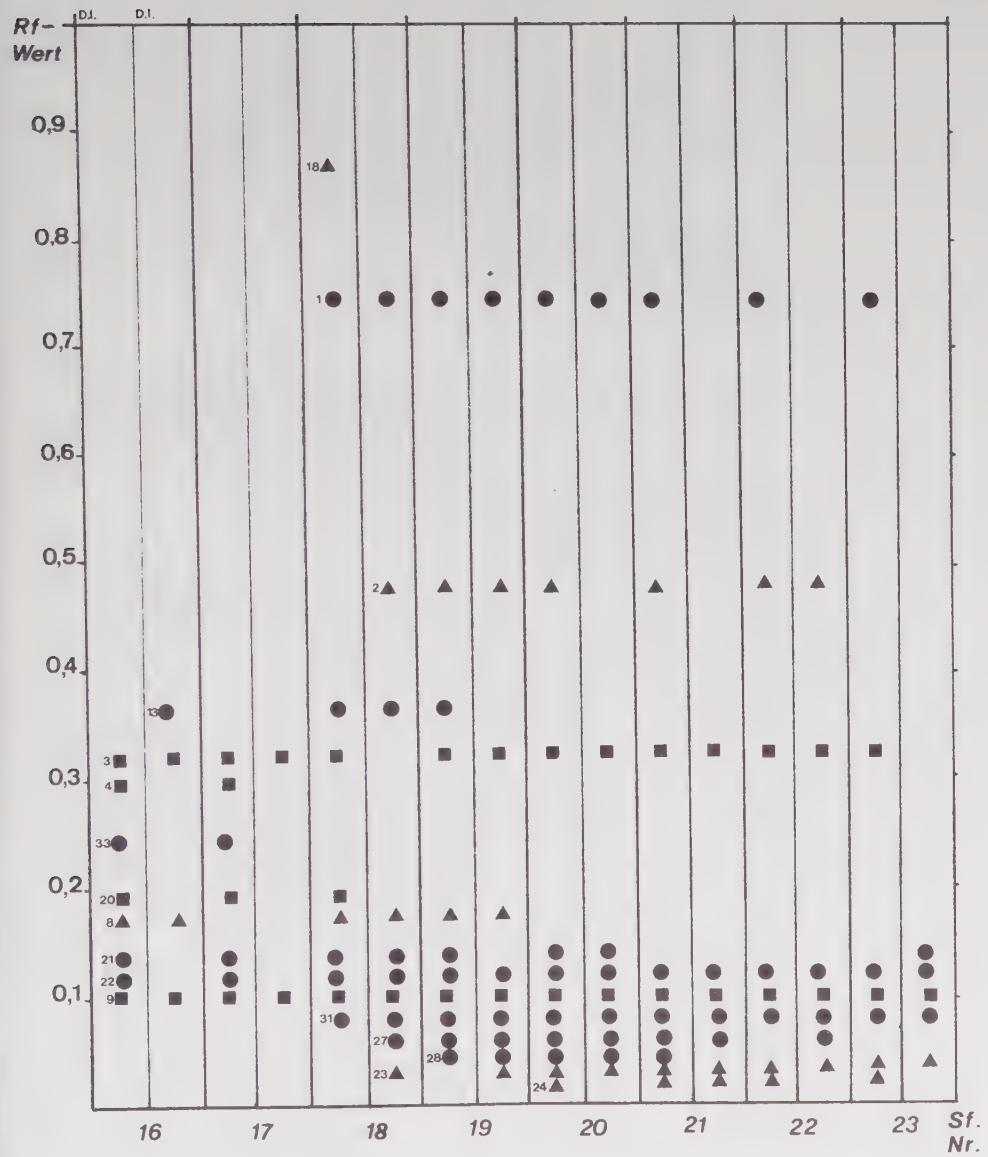
FRONT: 32cm

Rf-Wert	Fluoreszenz-farbe	Glykosid Nr.	Name des Glykosids	Vor-kommen Sf.Nr.
0,83	gelb	1	Lanatosid A	9-14
0,82	blau	47	Digitoxin	12-13
0,79	blau	53	Digoxigenin-bis-digitoxosid	-
0,72	blau	6	Lanatosid E	10-13
0,69	blau	61	Verodoxin	-
0,68	blau	49	Diginatin	-
0,63	blau	60	Strospesid	11-13
0,62	gelb	62	Digiprosid	8-11
0,54	grün	2	Lanatosid B	11-14
0,52	gelb	7	Purpureaglykosid A	11-14
0,50	blau	30	Gluco-digitoxigenin allomethylosid	-
0,41	gelb	13	Gluco-digitoxigenin-bisdigitoxosid	12-16
0,36	blau	3	Lanatosid C	15-16
0,34	gelb	32	Gluco-digitoxigenin acetyl-glucomethylosid	-

Fortsetzung der Tabelle zur Abbildung 2:

Rf-Wert	Fluoreszenz-farbe	Glykosid Nr.	Name des Glykosids	Vorkommen Sf.Nr.
0,33	gelb	17	Gluco-evatromonosid	12-16
0,24	gelb	33	Digitoxigenin-glucosid	12-14
0,20	blau-grau	20	Gluco-lanadoxin	12-15
0,19	blau-grün	8	Purpureaglykosid B	14-16
0,15	gelb	21	Odorobiosid G	16
0,14	gelb	22	Neo-odorobiosid G	-
0,12	blau	9	Desacetyl-lanatosid C	16
0,10	gelb	31	Gluco-digitoxigenin glucomethylosid	15-16
0,09	gelb	25	Glucoverodoxin	14-16
0,09	gelb	26	Neo-glucoverodoxin	14-16
0,09	grün	18	Glucogitorosid	-
0,08	gelb	27	Glucodigifucosid	-
0,07	gelb	28	Neo-glucodigifucosid	-
0,04	grün-blau	24	Neo-digitalinum verum	-
0,03	grün	23	Digitalinum verum	16

fraktionen 16 bis 23 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77.Die Abbildung zeigt die in der jeweiligen Säulenfraktion gefundenen Glykoside.



● = Glykoside des A-Typs

▲ = Glykoside des B-Typs

■ = Glykoside des C-Typs

Tabelle zur Abbildung 3:
Papierchromatographie der Säulenfraktionen 16 bis 23 der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77

FLIESSMITTEL: Chloroform 50
Tetrahydrofuran 50
Formamid 4,5

IMPRÄGNIERUNG: Formamid

METHODE: absteigende Papierchromatographie

TEMPERATUR: 20°C beim Auftragen und im Chromatographieraum

LAUFZEIT: 12,5 Stunden

FRONT: 33cm

Bei den Fraktionen 16 bis 23 wurde durch die absteigende Methode der Papierchromatographie eine etwas bessere Trennung der Glykoside und damit deutlichere Unterschiede bei den Rf-Werten erreicht.

Rf-Wert	Fluoreszenz-farbe	Glykosid Nr.	Name des Glykosids	Vorkommen Sf.Nr.
0,86	grün	18	Glucogitorosid	18
0,73	gelb	1	Lanatosid A	18-20
0,46	grün-blau	2	Lanatosid B	19/22
0,32	blau	3	Lanatosid C	16-22
0,18	blau	20	Gluco-lanadoxin	16/18
0,17	grün	8	Purpureaglykosid B	16-19
0,13	gelb	21	Odorobiosid G	18-20
0,11	gelb	22	Neo-odorobiosid G	18-23
0,10	blau	9	Desacetyl-lanatosid C	16-23
0,07	gelb	31	Glucodigitoxigenin-glucomethylosid	18-23
0,06	grün	25	Glucoverodoxin	-
0,06	gelb	27	Glucodigifucosid	19-20
0,04	gelb	28	Neo-glucodigifucosid	19
0,03	grün-blau	23	Digitalinum verum	18-23
0,02	grün-blau	24	Neo-digitalinum verum	20-23

c.)Glykosidkarten zur Papierchromatographie

Die folgenden Glykosidkarten zeigen in Analogie zu KAISER(1966) das gesamte Glykosidmuster der papierchromatographisch untersuchten Vertreter der Digitalis leucophaea "Athos".
Es können die in den einzelnen Säulenfraktionen gefundenen Glykoside mit ihrem Rf-Wert beim jeweils verwendeten Fließmittelsystem entnommen werden.

Dargestellt ist das qualitative Glykosidmuster.

Für die Glykoside werden Symbole verwendet:

● = A-Glykoside(gelbe Fluoreszenz)

▲ = B-Glykoside(grüne oder grüngelbe Fluoreszenz)

■ = C-Glykoside(blaue oder stahlblaue Fluoreszenz)

Die Nummern der Glykoside entsprechen denen der Tabellen und den bei Kaiser verwendeten.

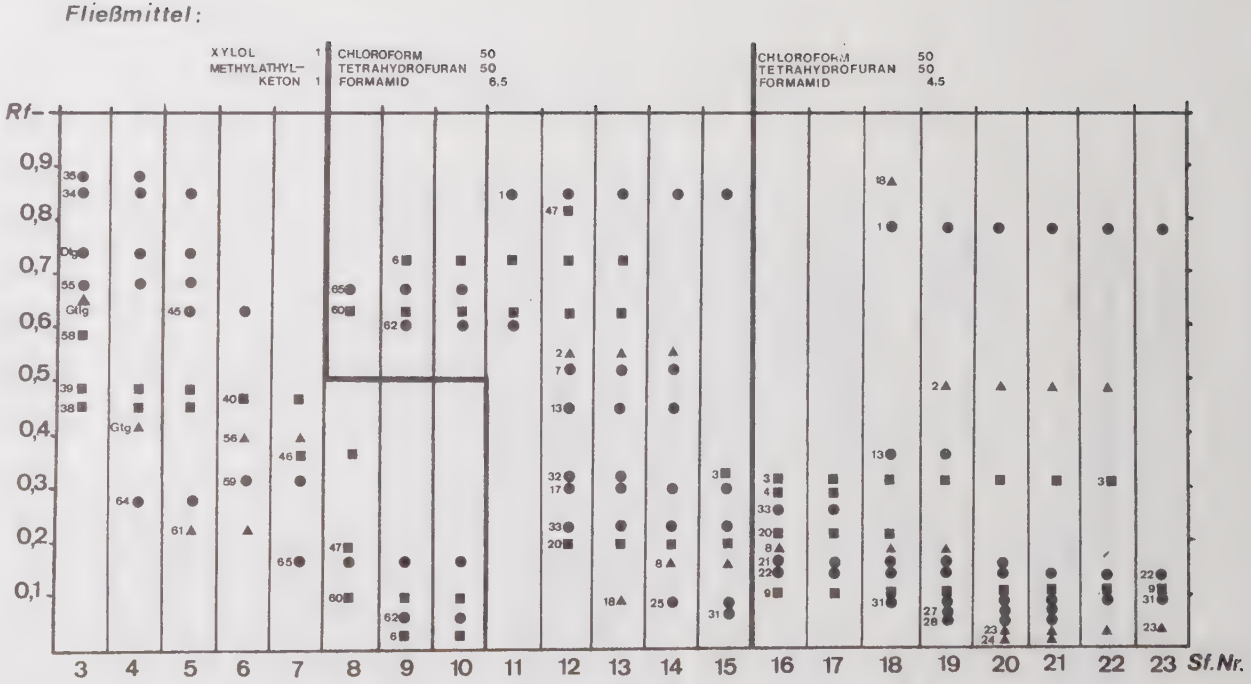


Abb. 4: Gesamtübersicht des Glykosidspektrums der Digitalis leucophaea Nr. 71

(PAPIERCHROMATOGRAPHIE)

● =A– Glykoside
▲ =B– Glykoside
■ =C– Glykoside

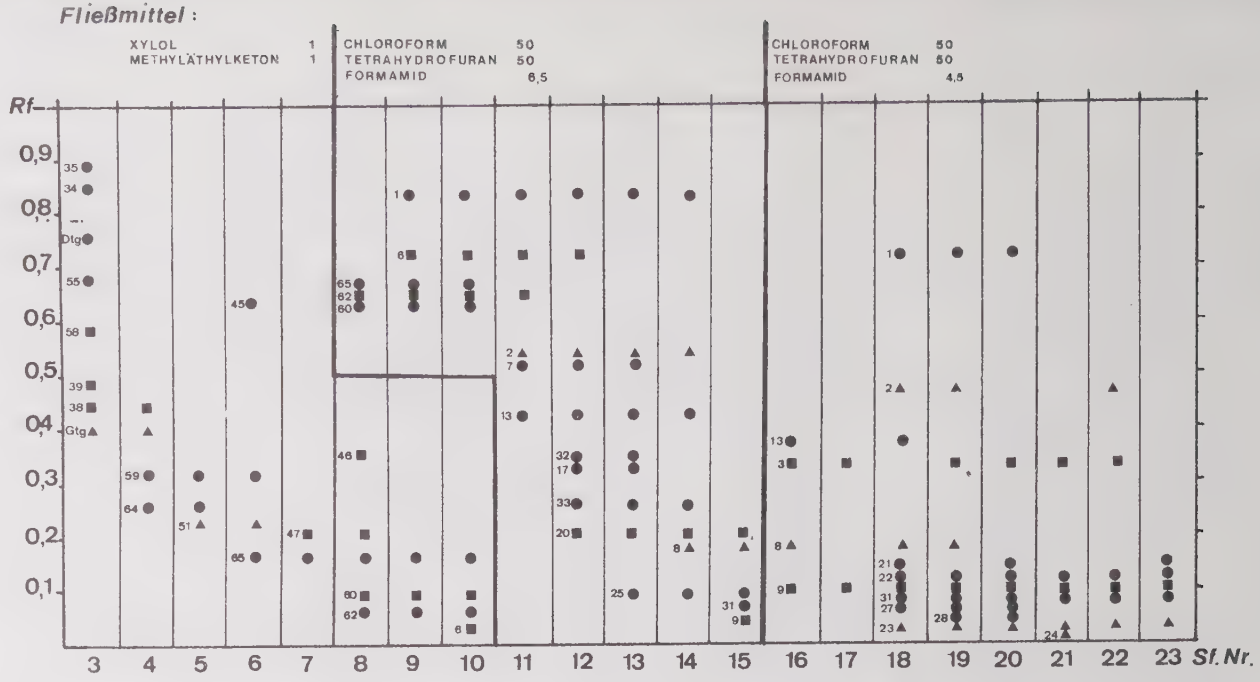


Abb.5: Gesamtübersicht des Glykosidspektrums der Digitalis leucophaea Nr.77

(PAPIERCHROMATOGRAPHIE)

● = A – Glykoside
▲ = B – Glykoside
■ = C – Glykoside

IV.)DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER TEIL DER UNTERSUCHUNG.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Säulenfraktionen richtet sich zunächst nach den allgemein gültigen Regeln unter Beachtung der Arbeiten auf dem Gebiet der Steroid und Herzglykosid Untersuchungen mit dieser Technik.(KAISER,HAAK,SPRINGLER, Liebigs Ann.Chem.Bd.603)

MATERIAL:

Es wurde mit DC-Fertigplatten Kieselgel 60F-254 der Firma Merck gearbeitet.Die Platten wurden entwickelt in Glaskammern für die Dünnschichtchromatographie mit Schliffdeckel der Firma Desaga,Heidelberg.
Im Verlauf der Arbeit wurde deutlich,daß eine eventuelle Kammersättigung unerheblich war. Die erhaltenen Rf-Werte waren bei gleichem Entwicklungsmittel und gleicher Plattenimprägnierung untereinander nur dann reproduzierbar,wenn die Raumtemperatur und der Feuchtigkeitsgehalt der Luft zum Zeitpunkt des Auftragens der Probe- und Vergleichslösungen in etwa übereinstimmten.Einige Grad Raumtemperatur oder wenige Prozent Luftfeuchtigkeits-Unterschied zeigten erheblichen Einfluß auf den Rf-Wert.Die späteren Aussagen gelten für durchschnittlich 20°C Raumtemperatur und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50%.

AUFTRAGEN DER FRAKTIONS- UND VERGLEICHSSUBSTANZ-LÖSUNGEN:

Die Probe- und Vergleichslösungen wurden an der Startlinie 1,5cm vom unteren Plattenrand in einem Abstand 2,5cm vom seitlichen Plattenrand und 1,5cm oder 2cm untereinander punktförmig aufgetragen.
Jeweils 1µl bis 5µl einer Säulenfraktionslösung und gleiche Mengen der Vergleichslösungen bekannter Konzentration wurden je nach Erfordernis mittels 1µl,2µl oder 5µl Pipette Microcaps Drummond aufgetragen.

In der Regel kamen 100ml Fließmittel ohne Kammersättigung bei durchschnittlich 20°C Raumtemperatur zum Einsatz.

IMPRÄGNIERUNG:

Einige Platten wurden vor dem Auftragen von Säulenfraktionslösung und Vergleichssubstanzlösung mit einer 20%-igen(Vol.%)Lösung von Formamid in Aceton imprägniert.Die Imprägnierung geschah im Tauchbad für etwa 10sec. (HAMMERSTEIN,KAISER 1972)
Anschließend wurden die Platten zwischen mehreren Lagen Filtrierpapier abgepresst und zur vollständigen Entfernung des Acetons etwa 5 Minuten lang in einen Trockenschrank von 100°C gestellt,bis das Formamid in Form schwacher weißer Nebel abzudampfen begann. Auf die wieder abgekühlten Platten konnten die Substanzlösungen aufgetragen werden.

Imprägnierte Platten wurden nach dem Entwickeln etwa 30 Minuten in einen Trockenschrank bei 150°C gelegt.

DETEKTION:

Alle Platten wurden nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Hilfe der Desaga "Spray-Gun" mit Trichloressigsäure/Chloramin T Reagenz besprüht.Das Reagenz kam in veränderter Form zum Einsatz(BOY 1975): 15 Volumenteile einer 25%-igen Trichloressigsäurelösung in Äthanol wurden mit 1 Volumenteil einer 5%-igen wässrigen Chloramin T Lösung gemischt. Mit diesem Gemisch wurden die Platten gleichmäßig besprüht und sofort für 10 Minuten bei 150°C in den Trockenschrank gelegt.Das Sprühreagenz wurde vor dem Gebrauch stets frisch zubereitet.

AUSWERTUNG:

Die Auswertung erfolgte am Desaga Uvis im langwelligem UV-Licht bei 360nm.Mit Hilfe des am Gerät befindlichen Stativs war es möglich,mit aufgeschraubter Spiegelreflexkamera DC-Platten zu dokumentieren.Die Dokumentation auf Negativfilm konnte durch Wechselschaltung unter UV-Licht und bei Tageslichtvisualisation vorgenommen werden.

Auf den Dünnschichtchromatogrammen wurde Fleckengröße und Fluoreszenzintensität der in den Säulenfraktionen gefundenen Substanzen mit denen der Vergleichssubstanzen verglichen,die in bekannten Konzentrationen mitgelaufen waren.Bei den anhand des Rf-Wertes und der Fluoreszenzfarbe identifizierten Glykosiden wurde die jeweils entsprechende Vergleichssubstanz zur Auswertung hinzugezogen.

Die qualitative und quantitative Auswertung wurde in dem Bereich des Dünnschichtchromatogrammes vorgenommen,in dem je nach Art des verwendeten Fließmittels eine gute Trennung der Vergleichssubstanzen und der Fraktionssubstanzen erkennbar war.

Von allen Säulenfraktionen wurde für jede gefundene Substanz der Durchschnitt aller Werte errechnet,die von den mit verschiedenen Fließmitteln gelaufenen Platten erhalten wurden.Die aufaddierten Durchschnittswerte einer Substanz in den verschiedenen Säulenfraktionsproben wurden auf die ursprünglich vorhandene Menge an Fraktionsgut umgerechnet.

Die in einzelnen Fraktionslösungen enthaltenen Ballaststoffe(Frühfraktionen 3 bis 5 und Spätfraktionen 19 bis 23) störten die Auswertung nicht wesentlich.Im Chromatogramm verursachten sie bei der unbesprühten Platte im Tageslicht leicht gelbgrün bis gelborange Bahnen oder Flecke, deren Farbe auch in den Säulenfraktionslösungen vorlag.
Unter UV-Licht und nach dem Besprühen zeigten sie leichte Fluoreszenzen.Farbe und Intensität der Substanzfluoreszenzen wurden aber nicht beeinflußt. In den Fraktionen 3 bis 5 der untersuchten Pflanzenextrakte ergaben sich im oberen Bereich der Chromatogramme hierdurch anfangs orange fluoreszierende Flecke,die bei abklingender Fluoreszenz sehr bald stumpf wurden und auf den Platten bei Tageslicht als braungelbe Zonen erkennbar blieben.

Es kann angenommen werden,daß es sich um Anthrachinonverbindungen handelt.Solche Verbindungen wurden von FURUYA und KOJIMA(1971) und von FURUYA, KOJIMA und KATSUKA(1972) aufgeklärt und sind von BÜCHNER und STABA(1964) ebenfalls in Chromatogrammen von Digitalis lanata Gewebeextrakten gefunden worden.

VERGLEICHSSUBSTANZEN:

Die Vergleichssubstanzen wurden vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen und von Herrn Dr.Kaiser(Boehringer-Mannheim) zur Verfügung gestellt.Die Nummern der Vergleichssubstanzen entsprechen denen der Kaiser Literatur und wurden zur Erleichterung beibehalten.

Es standen zur Verfügung:
Lanatosid A (Nr.1)
Lanatosid B (Nr.2)
Lanatosid C (Nr.3)
Purpureaglykosid A (Nr.7)
Purpureaglykosid B (Nr.8)
Desacetyl-lanatosid C (Nr.9)
Gluco-digitoxigenin-bis-digitoxosid (Nr.13)
Gluco-evatromonosid (Nr.17)
Glucogitorosid (Nr.18)
Gluco-lanadoxin (Nr.20)
Odorobiosid G (Nr.21)
Neo-odorobiosid G (Nr.22)
Digitalinum verum (Nr.23)
Neo-digitalinum verum (Nr.24)
Glucoverodoxin (Nr.25)
Glucodigifucosid (Nr.26)
Neo-glucodigifucosid (Nr.27)
Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid (Nr.31)
Digitoxigeninglucosid (Nr.33)
α-Acetyldigitoxin (Nr.34)
β-Acetyldigitoxin (Nr.35)
α-Acetalgitoxin (Nr.36)
α-Acetyldigoxin (Nr.38)
β-Acetyldigoxin (Nr.39)
α-Acetylgitaloxin (Nr.43)
Digitoxin (Nr.45)
Gitoxin (Nr.46)
Digoxin (Nr.47)
Neodigoxin (Nr.48)
Diginatin (Nr.49)
Gitaloxin (Nr.50)

Liste der zur Verfügung gestandenen Vergleichssubstanzen:

Gitoxigenin-bis-digitoxosid (Nr.52)
Digoxigenin-bis-digitoxosid (Nr.53)
Evatromonosid (Nr.55)
Gitorosid (Nr.56)
Digoxigenin-digitoxosid (Nr.57)
Lanadoxin (Nr.58)
Odorosid H (Nr.59)
Strospesid (Nr.60)
Verodoxin (Nr.61)
Digitoxigenin-gluco-methylosid (Nr.65)
Neo-digoxosid (Nr.67)
16-Acetylgitoxin (Nr.68)
Digitoxigenin (Dtg)
Gitoxigenin (Gtg)
Digoxigenin (Dgg)
Gitaloxigenin (Gtlg)

METHODEN DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE, DETEKTIONSMITTEL UND FLIESSMITTELSYSTEME.

Da auf dem Gebiet der Herzglykosidanalytik eine große Literaturfülle zur Verfügung stand und zahlreiche dünnschichtchromatographische Untersuchungen (meist zur Identifizierung und Trennung einzelner Glykoside)vorlagen,wurden zu Beginn der DC-Untersuchung einige Versuche mit unterschiedlichsten Methoden,Fließ- und Detektionsmitteln gemacht,um eine eventuelle Eignung für eine Gesamtanalyse festzustellen.

TECHNIKEN der Dünnschichtchromatographie:

a.)Zweidimensionale Technik

Mit der zweidimensionalen Technik wurden Versuche mit folgenden Systemen gemacht:

1.

I.Äthylacetat 16
Methanol 1
Wasser 1

II.Methyläthylketon
wassergesättigt,

oder wie von SJÖHOLM(1962) empfohlen:

2.

I.Methyläthylketon

II.Äthylacetat 5
Pyridin 1
Wasser 4.

b.)Technik der Mehrfachentwicklung

Es wurde mehrfach entwickelt in einer Ebene nach WALDI(1962) mit:

I.Cyclohexan:Aceton:Eisessig

II.Methyläthylketon
wassergesättigt

Die Vorschläge der zweidimensionalen Technik und die der Mehrfachentwicklung mögen in Einzeluntersuchungen ihren Vorteil haben, eignen sich aber im Rahmen der Aufgabenstellung:"Übertragen der Vollanalyse auf DC-Methoden" nicht.Es wurden mit diesen Methoden keine deutlich ausgebildeten Flecke erreicht.Der Gehalt an unterschiedlichen Glykosiden in den verschiedenen Säulenfraktionen ist zu groß,um nach diesen Methoden reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

DETEKTIONSMITTEL:

Es wurden verschiedene Detektionsmittel erprobt,so das von SJÖHOLM(1962) vorgeschlagene: p-Anisaldehyd 0,5
Aceton 10
Perchlorsäure 70% 5
Wasser 40,
wobei die Auswertung sofort und nach einer Stunde bei Tageslicht und unter UV- Licht erfolgte und die einzelnen Glykoside anhand der unterschiedlichen Färbungen zu identifizieren waren.

Ebenfalls eingesetzt wurde Xanthydrolreagenz nach PESEZS (1952) und das von MARTHOUD (1935) und RAYMOND (1938) benutzte "Raymond-Reagenz".

Bei den Versuchen mit den unterschiedlichsten Detektionsmitteln stellte sich heraus,daß es unerläßlich ist,mit Trichloressigsäure-Chloramin T -Reagenz zu arbeiten,um eine deutliche Aussage zur Einordnung der Glykoside zu machen.Mit diesem Reagenz konnten anhand der eindeutigen Fluoreszenzfarben und Intensitäten die besten Ergebnisse erzielt werden.

FLIESSMITTELBESCHREIBUNGEN:

1.)Fließmittel,die von der Papierchromatographie übernommen werden konnten.

Im Verlauf des experimentellen Teils zeigte sich, daß man eine gute Gesamtübersicht mit einigen Fließmitteln aus der Papierchromatographie erhalten konnte.
Für die Säulenfraktionen 3 bis 10 wurden die DC-Platten zunächst im Tauchbad für 30 Sekunden mit einer 20%-igen Formamidlösung in Aceton imprägniert.Nach dem Auftragen der Säulenfraktionslösungen und der Vergleichsglykosidlösungen wurde entwickelt mit:

Methyläthylketon 1
Xylol 1.

Dieses Fließmittel eignete sich für die Chromatographie der Sekundärglykoside und fand in modifizierter Form bei KAISER und HAMMERSTEIN(1972) Verwendung bei der Dünnschichtchromatographie von Digitalis Blattextrakten.

Ebenfalls geeignet war das von der Papierchromatographie übernommene Fließmittel:

Chloroform 50
Tetrahydrofuran 50
Formamid 6,5.

Auch hier wurden die DC-Platten zuvor mit Formamid/Aceton imprägniert.
Mit diesem Fließmittel wurden die Hauptglykoside der jeweiligen Säulenfraktion ebenfalls genügend deutlich getrennt und konnten mit Hilfe der Vergleichssubstanzen anhand der Fluoreszenzen und des Rf-Wertes identifiziert werden.

Außer den Fließmitteln,die von der Papierchromatographie übernommen werden konnten, wurden nachfolgende Fließmittelsysteme eingesetzt:

2.)Das von WALDI(in WICHTL:Methoden der Chemie, 1971,S.48)für die Mehrfachentwicklung von Glykosiden geringen polaren Unterschieds empfohlene Fließmittel: Cyclohexan 49
Aceton 49
Eisessig 2.

3.)Eine weitere Serie lief mit:
Methyläthylketon wassergesättigt.
Es wurde von MIYATAKE(1957) und STEIDLE(1963) für Primärglykoside verwendet.Dieses Fließmittel fand sich neben einer Menge anderer Fließmittelsysteme auch in einer Arbeit NOVERS (1969)und Mitarbeiter.Er verwendete
Methyläthylketon 5,4% wasserhaltig.
Zahlreiche Digitalisglykoside wurden von Nover in einem reichhaltigen Tabellenmaterial mit Rf- und Rm-Werten aufgelistet.Das dort in Tabellen erfaßte Material wurde bei diesem Fließmittel vergleichend mitbenutzt.Teilweise wurde die von Nover beschriebene Arbeitsmethode nachvollzogen.Dadurch konnten die Rf-Werte der Tabellen bei der Identifizierung einiger Glykoside helfen.(z.B.beim Digiprosid,hiervon stand keine Vergleichssubstanz zur Verfügung)

Die allgemeinen Arbeitsbedingungen bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung des Säulenfraktionsmaterials waren vergleichbar mit denen, die Nover beschrieb.So betrug die Temperatur des Chromatographieraumes 22°C $\pm$2°C,die relative Luftfeuchtigkeit 35-55% (meist um 50%) und die Laufstrecke 15cm.

Die von Nover während des Chromatographierens gemachten Beobachtungen(Einfluß der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit etc.)entsprachen den gemachten Erfahrungen.Ebenfalls wurden die Rf-Werte des dünnschichtchromatographischen Teils in der Regel von 20 Platten gemittelt.

4.)In Vorversuchen wurden ebenfalls als Fließmittel eingesetzt und auf allgemeine Verwendbarkeit untersucht:

Xylol 7,0
Methyläthylketon 10,5.

Das Fließmittel eignete sich für die Säulenfraktionen 3 bis 10.

Für die Säulenfraktionen 10 bis 23 gelangte:
Chloroform 5
Tetrahydrofuran 11
Formamid 0,5
zum Einsatz.
Beide Fließmittel verwendeten KARTNIG und KOBOSIL(1977) bei der Untersuchung von Digitalisglykosiden mit Hilfe der HPTLC.

5.)Ähnliche Fließmittel fanden sich bei IMRE und ERSOY(1977) zur Trennung von Primärglykosiden und Sekundärglykosiden in Extrakten der Digitalis schischkinii.Für die Fraktionen 3 bis 10 gelangten dort wie hier:
Xylol 1
Methyläthylketon 1
mit gutem Erfolg zum Einsatz.
Für Primärglykoside wurde bei Imre und Ersoy das System:
Äthylacetat 90
Äthanol 10
Wasser 5 auf Aceton/Wasser 3:2 imprägnierten Platten eingesetzt.Hier wurde es hauptsächlich bei den Schlußfraktionen 20 bis 23 verwendet.

6.)Einzelne Säulenfraktionen wurden wie bei GÖRLICH(1960) mit

Methyläthylketon	80
Toluol	10
Wasser	6
Methanol	5
Eisessig	2

chromatographiert.

7.)Neben dem Erproben zahlreicher Literaturfließmittel wurde auch versucht,diese Fließmittel eventuell zu modifizieren und zu verbessern. Diese Versuche zeigten keine deutlichen Erfolge. Allerdings zeigte sich beim Erproben der vielen Fließmittelsysteme,daß mit dem Fließmittel von STAHL(1970)

Äthylacetat	75
Methanol	10
Wasser	7,5

bei allen Säulenfraktionen gute Ergebnisse erzielt wurden.Dieses Fließmittel läßt auch das Europäische Arzneibuch III bei der Reinheitsprüfung von Digitalis purpureae folium verwenden.Es wurde bei allen Säulenfraktionen der drei Digitalis leucophaea Herkünfte als Universalfließmittel eingesetzt.

Da die qualitative und quantitative Untersuchung mit Hilfe von Vergleichsglykosiden in bekannten Konzentrationsreihen durch Vergleich der Rf-Werte,Fluoreszenzfarbe und Intensität durch Abschätzen vorgenommen wurde,erwies sich das Fließmittel sowohl für Säulenfraktionen mit Primär- als auch für die mit Sekundärglykosiden geeignet.Bei der angewendeten Methode konnte die Trennschärfe als ausreichend bezeichnet werden, da keine Direktfluorimetrie erfolgte.
Die abgeschätzten Werte lagen in den meisten Fällen innerhalb der Toleranzgrenze zu Vergleichswerten,die von Kaiser(Fa.Boehringer-Mannheim)durch Direktfluorimetrie bei gleichem Untersuchungsmaterial ermittelt wurden.

Eine schnelle,allgemeine Übersicht über das Glykosidmuster der Digitalis leucophaea war außer mit dem Fließmittel:
Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5
auch mit dem Fließmittel:
Methyläthylketon
wassergesättigt
zu erreichen.
Zwar gilt Methyläthylketon/H_2O als besonders geeignet für die Chromatographie von Primärglykosiden,ließ aber bei der durchgeführten Arbeitsweise Aussagen über die Zusammensetzung des Glykosidmusters aller Säulenfraktionen zu.

Bei eventuellen Schwierigkeiten innerhalb einer Säulenfraktion konnte mit Hilfe eines speziellen Fließmittels Aufklärung erreicht werden.Bevorzugt wurden in solchen Fällen die unter 4 und 5 aufgeführten Fließmittelsysteme.

Die mit den einzelnen Fließmittelsystemen erhaltenen Rf-Werte wurden in Tabellen am Ende der Beschreibung der dünnschichtchromatographischen Untersuchung zusammengefaßt. Die dort angegebenen Rf-Werte sind selbstverständlich relativ zu sehen(Einfluß von T°C, rel.% Feuchte),sie wurden in der Regel aus 20 Einzelwerten gemittelt.Das Verhätnis der Werte zueinander innerhalb einer Versuchsserie mit einem Fließmittelsystem erwies sich als konstant.

Aus den Ergebnissen der PC- und DC-Versuche mit Konzentrationsreihen der Vergleichsglykoside entstand die Schlußtabelle der gefundenen Inhaltsstoffe der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77,die aus dem Samenmaterial kultiviert waren,das von Pflanzen am Berge Athos stammte.

In diese Tabelle wurden auch die Ergebnisse der untersuchten Digitalis leucophaea eingefügt,die aus dem Samenmaterial kultiviert waren,das von Pflanzen der Insel Euböa stammte.Die Säulenfraktionen dieser Digitalis leucophaea wurden ausschließlich dünnschichtchromatographisch untersucht.

Der Beschreibung dieser Untersuchung wurden erst Abbildungen einiger DC-Platten vorangestellt.Sie zeigen die Trennung unterschiedlicher Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77 mit unterschiedlichen Fließmittelsystemen. Da mit einigen Systemen ganze Reihenuntersuchungen erfolgten, wurden jeweils ein paar Beispiele herausgesucht und stellvertretend vorgestellt.

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINIGER DC-PLATTEN
DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG
DER DIGITALIS LEUCOPHAEA NR.71 UND NR.77(ATHOS).

Die folgenden schematischen Darstellungen zeigen die Trennung unterschiedlicher Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77(Athos). Es werden verschiedene Systeme vorgestellt.

Da mit einigen Fließmittelsystemen ganze Reihenuntersuchungen erfolgten,wurden jeweils ein paar Beispiele herausgesucht und stellvertretend vorgestellt.

Die Glykoside,die in den jeweiligen Säulenfraktionen gefunden wurden,und die verwendeten Vergleichsglykoside werden durch Symbole dargestellt.Die Größe der Symbole deutet das quantitative Verhältnis der Glykoside zueinander an.

An Symbolen wurde verwendet:

● = A-Glykoside(gelbe Fluoreszenz)

▲ = B-Glykoside(grüne-gelbgrüne Fluoreszenz)

■ = C-Glykoside(blaue-stahlblaue Fluoreszenz)

Der Seite mit der Abbildung der DC-Platte ist eine Seite mit Erklärungen zur schematischen Darstellung nachgestellt.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für ein Fließmittelsystem das von der Papierchromatographie übernommen wurde.

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL:Chloroform 50
Tetrahydrofuran 50
Formamid 6,5

IMPRÄGNIERUNG: 20% Formamid in Aceton

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 52%

FRONT: 15cm

LAUFZEIT: 110 Minuten

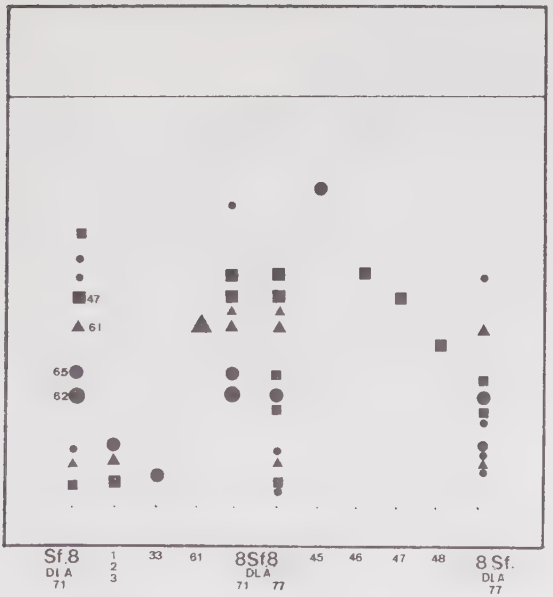
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB:1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.8 D.1.Nr.71 und Nr.77

VERGLEICHSGLYKOSIDE: Nr.1+2+3;Nr.33;Nr.61;Nr.45;
Nr.46;Nr.47;Nr.48



● = gelbe Fluoreszenz
▲ = grüne-gelbgrüne Fluoreszenz
■ = blaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren,2,5cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1,5cm untereinander markiert.Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette 2µl der Säulenfraktionslösung und 1µl der Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration punktförmig aufgetragen.Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.8(Sf.8)beider Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77.
An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:
Lanatosid A (1)
Lanatosid B (2)
Lanatosid C (3)
Digitoxigenin-glucosid (33)
Verodoxin (61)
Digitoxin (45)
Gitoxin(46)
Digoxin(47)
Neodigoxin (48)

Die am äußeren Plattenrand aufgetragenen Säulenfraktionslösungen liefen etwas verzogen.

Sicher gefunden wurden die Lanatoside A,B und C (1+2+3),sie traten in dieser Fraktion zum ersten Mal auf.
Den Hauptanteil der Glykoside in diesen Säulenfraktionen stellten Verodoxin(61) und Digoxin(47) sowie die Glykoside Digiprosid(62) und Digitoxigenin-glucomethylosid(65).Die beiden letztgenannten fluoreszierten gelb und konnten auf weiteren Platten mit diesen Säulenfraktionen anhand der dort mitgelaufenen Vergleichsglykoside sicher identifiziert werden.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem"CAE".

PLATTENMATERIAL: Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Cyclohexan 49
Aceton 49
Eisessig 2

TEMPERATUR: 20°C
LUFTFEUCHTIGKEIT:50%

FRONT:15cm

LAUFZEIT:100 Minuten

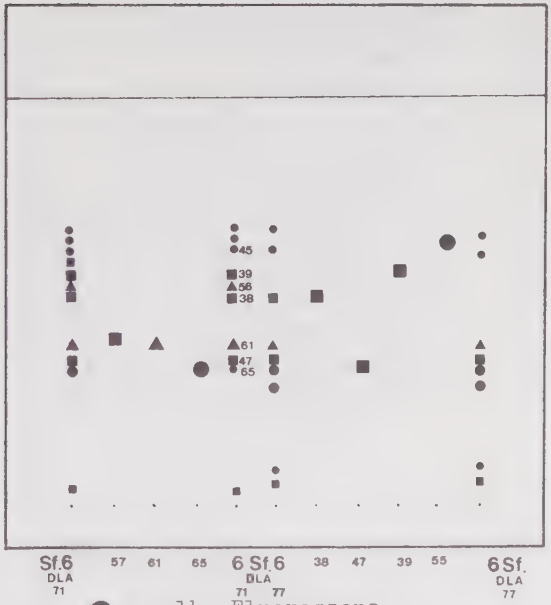
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB: 1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.6 D.1.Nr.71 und Nr.77

VERGLEICHSGLYKOSIDE: Nr.38;Nr.39;Nr.55;Nr.47;
Nr.57;Nr.61;Nr.65



● = gelbe Fluoreszenz

▲ = grüne-gelbgrüne Fluoreszenz

■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung der schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 2,5cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1,5cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration punktförmig aufgetragen. Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.6(Sf.6)beider Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77.
An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:
Digoxigenin-digitoxosid (57)
Verodoxin (61)
Digitoxigenin-glucomethylosid (65)
α-Acetyldigoxin (38)
Digoxin (47)
β-Acetyldigoxin (39)
Evatromonosid (55)
Die Auswahl der Vergleichsglykoside orientierte sich an den Ergebnissen der Papierchromatographie und an der Erwartung des Auftretens bestimmter Glykoside nach den Untersuchungen bei Kaiser.

Gefunden wurde Digoxin(47) sowie α+βAcetyl-digoxin, die in dieser Säulenfraktion letztmalig auftraten.
Verodoxin(61) ist anteilmäßig in diesen Fraktionen am stärksten vertreten gewesen, Digitoxigenin-glucomethylosid trat zum ersten Mal auf.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem"MÄK+H_2O".

PLATTENMATERIAL: Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Methyläthylketon
wassergesättigt

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 52%

FRONT: 15cm

LAUFZEIT: 105 Minuten

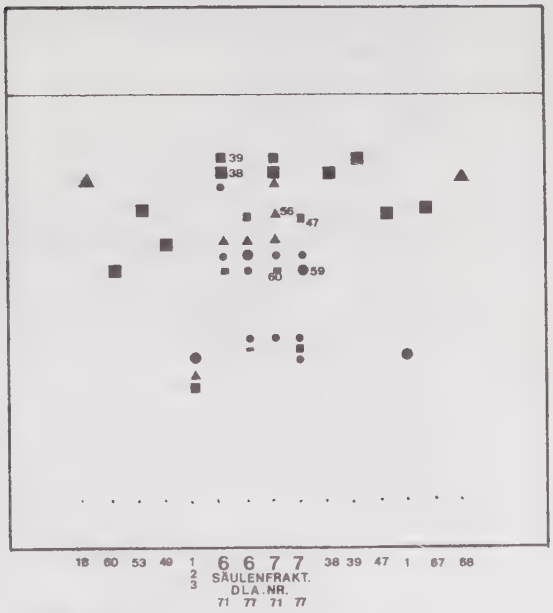
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB: 1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.6 und Nr.7 DLA.Nr.71 und Nr.77

VERGLEICHSGLYKOSIDE:Nr.18;Nr.60;Nr.53;Nr.49;Nr.1
Nr.2;Nr.3; Nr.38;Nr.39;Nr.47;
Nr.67;Nr.68.



● = gelbe Fluoreszenz
▲ = grüne-gelbgrüne Fluoreszenz
■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite.

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 3cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2 µl der Säulenfraktions- und 1 µl der Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration punktförmig aufgetragen. Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.6(Sf.6)und Nr.7(Sf.7) beider Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77(Athos).
An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

Glucogitorosid (18) Strospesid(60)
Digoxigenin-bis-digitoxosid (53)
Diginatin (49)
Lanatosid A+B+C(1+2+3)
α+βAcetyldigoxin(38+39)
Digoxin (47)
Neo-digoxosid(67)
16-Acetylgitoxin(68)

Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der frühen Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

Wie erwartet wurden α+β Acetyldigoxin(38+39) noch deutlich nachgewiesen. Ebenso fand sich Digoxin(47) und Strospesid(60) in den Säulenfraktionen.
In der Säulenfraktion Nr.7 der Digitalis leucophaea Nr.77 zeigte sich zum ersten Mal Lanatosid A(1).

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem "MÄK/H_2O".

PLATTENMATERIAL: Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Methyläthylketon
wassergesättigt

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 52%

FRONT: 15cm

LAUFZEIT: 110 Minuten

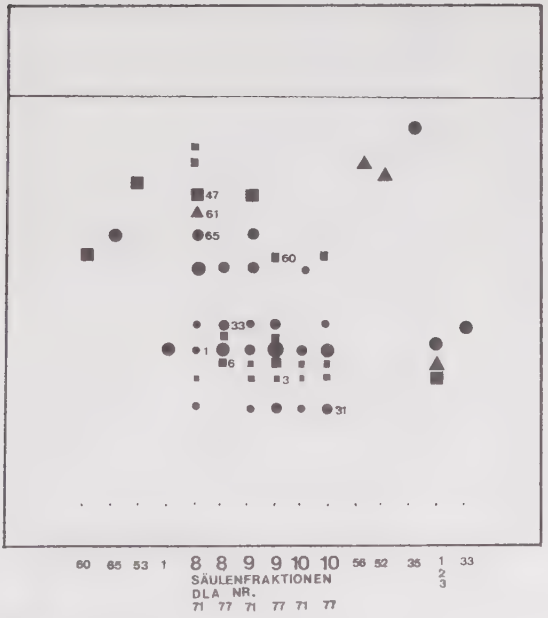
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB:1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.8,Nr.9 und Nr.10 der DLA.Nr.71
und der DLA.Nr.77

VERGLEICHSGLYKOSIDE:Nr.60;Nr.65;Nr.53;Nr.1;Nr.56
Nr.52;Nr.35;Nr.1+2+3;Nr.33.



● = gelbe Fluoreszenz
▲ = grüne-gelbgrüne Fluoreszenz
■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 3cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration punktförmig aufgetragen.
Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.8,Nr.9 und Nr.10 beider Digitalis leucophaea Blattextrakte Nr.71 und Nr.77(Athos).

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:
Strospesid(60)
Digoxigenin-bis-digitoxosid(53)
Digitoxigenin-glucomethylosid (65)
Lanatosid A+B+C(1+2+3)
Gitorosid(56)
Gitoxigenin-bis-digitoxosid(52)
Acetyldigitoxin(35)
Digitoxin-glucosid(33).

Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der mittleren Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

In den mittleren Säulenfraktionen fand sich neben Strospesid(60) und Digitoxigenin-glucomethylosid(65) bereits Lanatosid A(1).In der Säulenfraktion Nr.9 der Digitalis leucophaea Nr.77 war Lanatosid A(1) bereits das die Fraktion charakterisierende Glykosid.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem "MÄK/H_2O".

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Methyläthylketon
wassergesättigt

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 50%

FRONT: 15cm

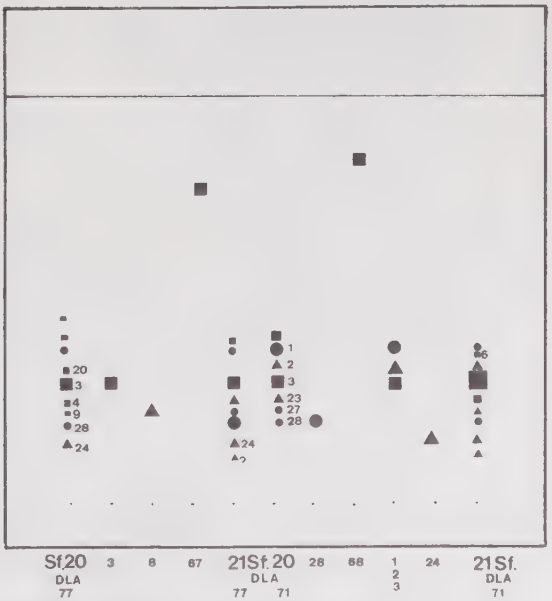
LAUFZEIT: 105 Minuten

DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz
AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB: 1:2

SÄULENFRAKTIONEN: Nr.20 und Nr.21 der DLA.71
und der DLA.77

VERGLEICHSGLYKOSIDE: Nr.3;Nr.8;Nr.67;Nr.28;Nr.68
Nr.1+2+3;Nr.24.



● = gelbe Fluoreszenz
▲ = grüne-grüngelbe Fluoreszenz
■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 2,5cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1,5cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösungen bekannter Konzentrationen punktförmig aufgetragen.
Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.2o und Nr.21 beider Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77(Athos).
An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

Lanatosid A+B+C (1+2+3)
Purpureaglykosid B (8)
Neo-digoxosid (67)
16-Acetylgitoxin (68)
Neo-digitalinum verum (24)
Neo-glucodigifucosid (28)
Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der späten Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

Lanatosid A(1) trat zum letztenmal auf,während Lanatosid C(3) die späten Säulenfraktionen charakterisierte.Ebenfalls typisch für diese Fraktionen war das Vorhandensein von Neo-glucodigifucosid(28),während die Glykoside Neo-digoxosid(67) und 16-Acetylgitoxin(68) nur zur Kontrolle der Rf-Werte auf anderen Platten dieses Systems aufgegeben waren.
In den späten Säulenfraktionen(Sf.Nr.18-23) zeigten die Glykoside mit diesem Fließmittelsystem nur mittlere und niedrige Rf-Werte.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem Äthylacetat:
Methanol:Wasser(75:10:7,5)

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL:Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 54%

FRONT:15cm

LAUFZEIT:95 Minuten.

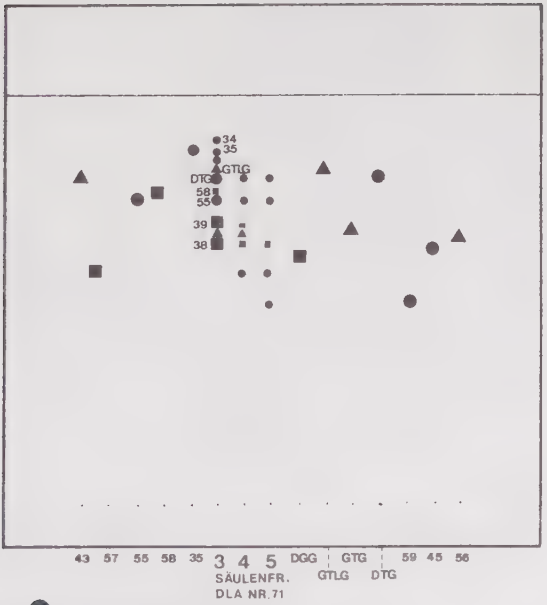
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB:1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.3,Nr.4 und Nr.5 der DLA.71

VERGLEICHSGLYKOSIDE:Nr.43;Nr.57;Nr.55;Nr.58;Nr.35;
Nr.59;Nr.45;Nr.56;Dgg;Gtlg;Gtg;
Dtg.



● = gelbe Fluoreszenz

▲ = grüne-grüngelbe Fluoreszenz

■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren,3cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösungen bekannter Konzentrationen aufgetragen.
Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.3,Nr.4 und Nr.5 des Digitalis leucophaea Blattextraktes Nr.71.

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:
α-Acetylgitaloxin(43)
Digoxigenin-digitoxosid(57)
Evatromonosid(55)
Lanadoxin(58)
β-Acetyldigitoxin(35)
Digoxigenin(Dgg)
Gitoxigenin(Gtg)
Gitaloxigenin(Gtlg)
Digitoxigenin(Dtg)
Odorosid H(59)
Digitoxin(45)
Gitorosid(56)
Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der frühen Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

Von den auf der DC-Platte mitgelaufenen Vergleichsglykosiden konnten Digitoxigenin(Dtg)und Odorosid H (59)sowie Evatromonosid(55) und Lanadoxin(58) nachgewiesen werden.Die Flecke dieser Glykoside überlagerten sich bei diesem Fließmittel,der sichere Nachweis wurde mit Fließmittelsystemen der Papierchromatographie erbracht.Ebenfalls wurdeα+βAcetyldigoxin(38+39)gefunden.Sie liefen auf anderen Platten dieser Fraktionen mit diesem System als Referenzlösung mit.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem Äthylacetat:
Methanol:Wasser(75:10:7,5)

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 54%

FRONT: 15cm

LAUFZEIT: 100 Minuten

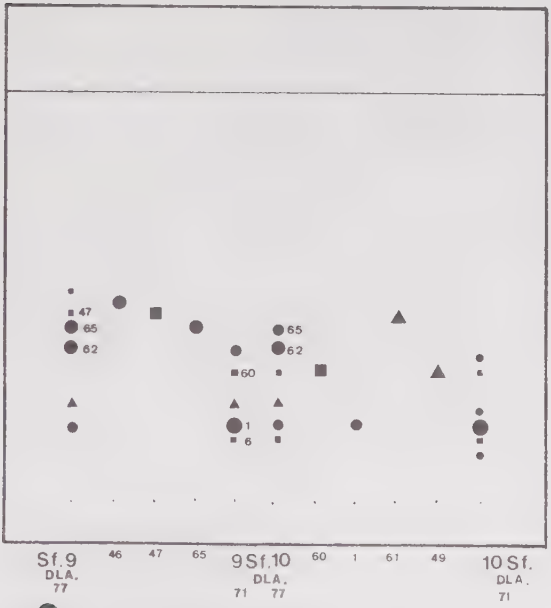
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB: 1:2

SÄULENFRAKTIONEN: Nr.9 und Nr.10 der DLA.71 und 77

VERGLEICHSGLYKOSIDE:Nr.46;Nr.47;Nr.65;Nr.60;Nr.1;
Nr.61;Nr.49.



● = gelbe Fluoreszenz

▲ = grüne-grüngelbe Fluoreszenz

■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 2,5cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1,5cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurden mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösungen bekannter Konzentrationen aufgetragen.
Die Front wurde auf 15 cm festgelegt.
Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.9 und Nr.10 der Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77(Athos).

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

Gitoxin(46)
Digoxin(47)
Digitoxigenin-glucomethylosid(65)
Strospesid(60)
Lanatosid A(1)
Verodoxin(61)
Diginatin(49)

Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der mittleren Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

Von den auf dieser Platte mitgelaufenen Vergleichsglykosiden konnte Digoxin(47),Strospesid(60) und Lanatosid A(1) sicher nachgewiesen werden. In den Säulenfraktionen Nr9 und Nr.10 der Digitalis leucophaea Nr.71 wurde deutlich mehr Lanatosid A(1) gefunden als in den gleichen Säulenfraktionen der Digitalis leucophae Nr.77.

Schematische Darstellung einer DC-Platte:
Beispiel für das Fließmittelsystem Äthylacetat:
Methanol:Wasser(75:10:7,5)

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)

FLIESSMITTEL: Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

TEMPERATUR: 21°C

LUFTFEUCHTIGKEIT: 52%

LAUFZEIT: 105 Minuten

FRONT: 15cm

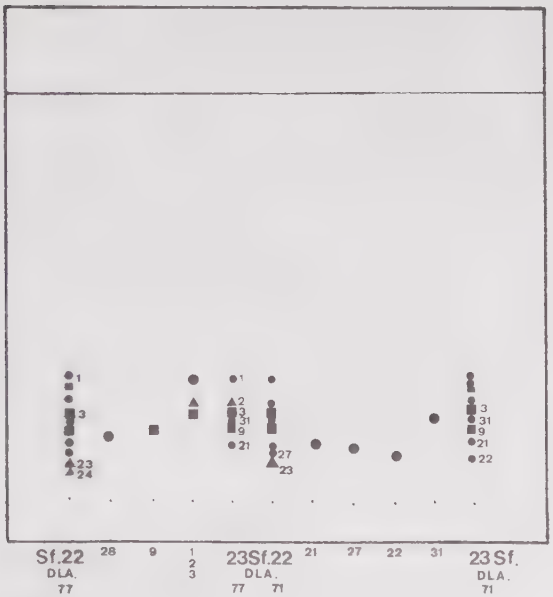
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz

AUSWERTUNG: UV-Licht 360nm

MASSTAB: 1:2

SÄULENFRAKTIONEN:Nr.22 und Nr.23 der DLA.71 und 77

VERGLEICHSGLYKOSIDE:Nr.28;Nr.9;Nr.1+2+3;Nr.21;
Nr.27;Nr.22;Nr.31.



Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platte der Vorseite:

Die Startpunkte wurden 1,5cm vom unteren, 2,5cm vom seitlichen Plattenrand und im Abstand von 1,5cm untereinander markiert.
Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 2µl der Säulenfraktions- und 1µl der Vergleichsglykosidlösungen bekannter Konzentration aufgetragen.
Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

Aufgetragen wurden:
Lösungen der Säulenfraktionen Nr.22 und Nr.23 der Digitalis leucophaea Extrakte Nr.71 und Nr.77(Athos).

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

Neo-glucodigifucosid(28)
Desacetyllanatosid C(9)
Lanatosid A+B+C(1+2+3)
Odorobiosid G(21)
Neo-odorobiosid G(22)
Glucodigifucosid(27)
Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid(31)

Die Platte wurde als Beispiel für das Fließverhalten der späten Säulenfraktionen mit diesem Fließmittelsystem gewählt.

In diesen Säulenfraktionen ging die Trennung der Glykoside nicht mehr so in die Breite,es wurden Rf-Werte erhalten,die sehr nahe beieinander lagen.Für die Methode:Bestimmung durch Abschätzen und Vergleich mit Referenzglykosiden reichte die Trennschärfe dennoch aus.

Außer Neo-glucodigifucosid(28) konnten alle Vergleichsglykoside gefunden werden,wobei wie erwartet Lanatosid C(3),Desacetyl-lanatosid C(9) und Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid(31) diese Fraktionen charakterisierten.

VERGLEICHENDE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG EINER DRITTEN DIGITALIS LEUCOPHAEA, DEREN URSPRÜNGLICHER STANDORT AUF DER INSEL EUBÖA ZU FINDEN WAR.

Im weiteren Verlauf der dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurde eine Digitalis leucophaea auf ihr Glykosidmuster untersucht, die im Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen aus Samenmaterial kultiviert worden war.Der Samen stammte von Pflanzen einer Digitalis leucophaea Population auf der Insel Euböa.

Die Säulenfraktionen dieser Pflanzen wurden von Herrn Dr.Kaiser(Boehringer Mannheim) freundlichst zur Verfügung gestellt.

FRAKTIONIERUNG:
Die Fraktionierung der Digitalis leucophaea der Herkunft Euböa erfolgte bei Boehringer Mannheim wie beschrieben:

46g Blattpulver der vereinigten Einzelpflanzen der Standortbeschreibung 30.625-10(ZERBST,Iter Graecum 1973) wurden zum Extrakt verarbeitet.

Extrakt Ausbeute:1,87g

Bereitung der Säulenfraktionen:
40g Kieselgel wurden mit mit 40g Wasser entaktiviert und trocken auf eine Säule gefüllt, die den Durchmesser von 3cm hatte.1,6g Blattextrakt wurden in Chloroform-Methanol 1:1 gelöst,auf 10g Kieselgel aufgegeben,gut vermischt und über Nacht getrocknet.Danach wurde es mit 10ml Wasser entaktiviert und auf die gefüllte Säule aufgegeben.

Die weitere Fraktionierung erfolgte entsprechend der Tabelle:

Säulenfraktions bei Kaiser	Nr. im DC-Versuch	Lösungsmittel	ml	Auswaage in mg
301	1	Benzol	150	5
302	2	Benzol-	120	38
303	3	Essigester(2:1)	120	25
304	4	Benzol-	120	36
305	5	Essigester(1:1)	120	42
306	6	Benzol-	120	65
307	7	Essigester(1:2)	120	24
308	8		150	40
309	9	Essigester	150	65
310	10		150	57
311	11	Essigester	150	80
312	12	+2%Äthanol	150	75
313	13	Essigester	150	26
314	14	+5%Äthanol	150	40
315	15	Essigester	150	15
316	16	+10%Äthanol	150	54
317	17	Essigester	150	32
318	18	+15%Äthanol	150	30
319	19	Essigester	150	34
320	20	+20%Äthanol	150	52
321	21	Essigester	150	22
322	22	+30%Äthanol	150	32
323	23	Essigester +50%Äthanol	200	160
324	24	Methanol	200	330
				=1.379

Die mg Auswaage wurde in Methanol:Chloroform 1:1 ad 5ml aufgenommen und in verschiedenen Serien chromatographiert,wobei 2µl,10µl oder 20µl Säulenfraktionslösung mit der Mikropipette Microcaps Drummond aufgetragen wurden. Als Vergleichsglykoside wurden die Lösungen der Glykoside bekannter Konzentration verwendet,die bereits bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77(Athos) zur Identifizierung herangezogen worden waren. In der Regel wurde mit 1µl oder 2µl der Vergleichsglykosidlösungen gearbeitet.

Wie sich bereits bei der Untersuchung der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77 gezeigt hatte,enthielten auch bei dieser Digitalis leucophaea(Euböa) die Säulenfraktionen Nr.1 und Nr.2(301+302) sowie die Säulenfraktion Nr.24(324) lediglich Ballaststoffe,so daß diese Säulenfraktionen bei der DC-Untersuchung unberücksichtigt bleiben konnten.

Zum Unterschied zu den Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77(Athos) enthielten bei der "Euböa"-leucophaea die späten Säulenfraktionen ab Nr.20 nur noch in Spuren erfassbare Glykosidanteile.

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE:

Nach einigen dünnschichtchromatographischen Vorversuchen mit den bereits beschriebenen Fließmittelsystemen wurde nach den Erfahrungen, die bei der DC-Untersuchung der Digitalis leucophaea Nr.71 und Nr.77 gemacht worden waren,hauptsächlich mit den folgenden Fließmittelsystemen gearbeitet:

I. Methyläthylketon
   wassergesättigt
und
II.Äthylacetat 75
   Methanol 10
   Wasser 7,5.

Diese Systeme hatten sich bei der Fülle der erprobten Fließmittelsysteme als geeignet gezeigt,die allgemeine qualitative dünnschichtchromatographische Untersuchung von Digitalis Extrakten zu vereinfachen.

Mit diesen Fließmitteln wurde eine gewisse Standartisierung der Methode erreicht,und sowohl Primärglykoside als auch Sekundärglykoside konnten qualitativ gut erfaßt werden.

Zwar wären diese Fließmittelsysteme für die quantitative Bestimmung durch Fluorimetrie nicht geeignet,da hierzu eine größere Trennschärfe erforderlich ist.Bei der hier angewendeten Methode:"Dünnschichtchromatographie mit Hilfe von Vergleichssubstanzen in Konzentrationsreihen und Bestimmung der Glykoside in den Säulenfraktionen durch Vergleich des Rf-Wertes,der Fleckengröße,Fluoreszenzfarbe und Fluoreszenzintensität" waren jedoch grob quantitative Aussagen bei diesen Fließmittelsystemen möglich.

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINIGER DC-PLATTEN DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG DER DIGITALIS LEUCOPHAEA(EUBÖA).

Die folgenden schematischen Darstellungen zeigen die Serienuntersuchung der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea,die im Arzneipflanzengarten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen aus Samenmaterial einer Digitalis leucophaea Population der Insel Euböa kultiviert worden war.

Die Säulenfraktionslösungen wurden auf drei DC-Platten mit der Mikropipette Microcaps Drummond zu je 20µl punktförmig aufgetragen.Der Abstand der Startpunkte betrug 1,5cm untereinander. Zwischen den Lösungen der Säulenfraktionen liefen 2µl der Lösung eines Leitglykosides in bekannter Konzentration mit.

Da für alle Platten die Front auf 15cm festgelegt worden war,wurde die schematische Darstellung der drei DC-Platten nebeneinander möglich,die einen Überblick über das gesamte Glykosidmuster dieser Digitalis leucophaea beim jeweiligen Fließmittelsystem erlaubt.

Die Glykoside ,die in den einzelnen Säulenfraktionen gefunden wurden,und die verwendeten Vergleichsglykoside wurden durch Symbole dargestellt.
An Symbolen wurde verwendet:

●=A-Glykoside(gelbe Fluoreszenz)

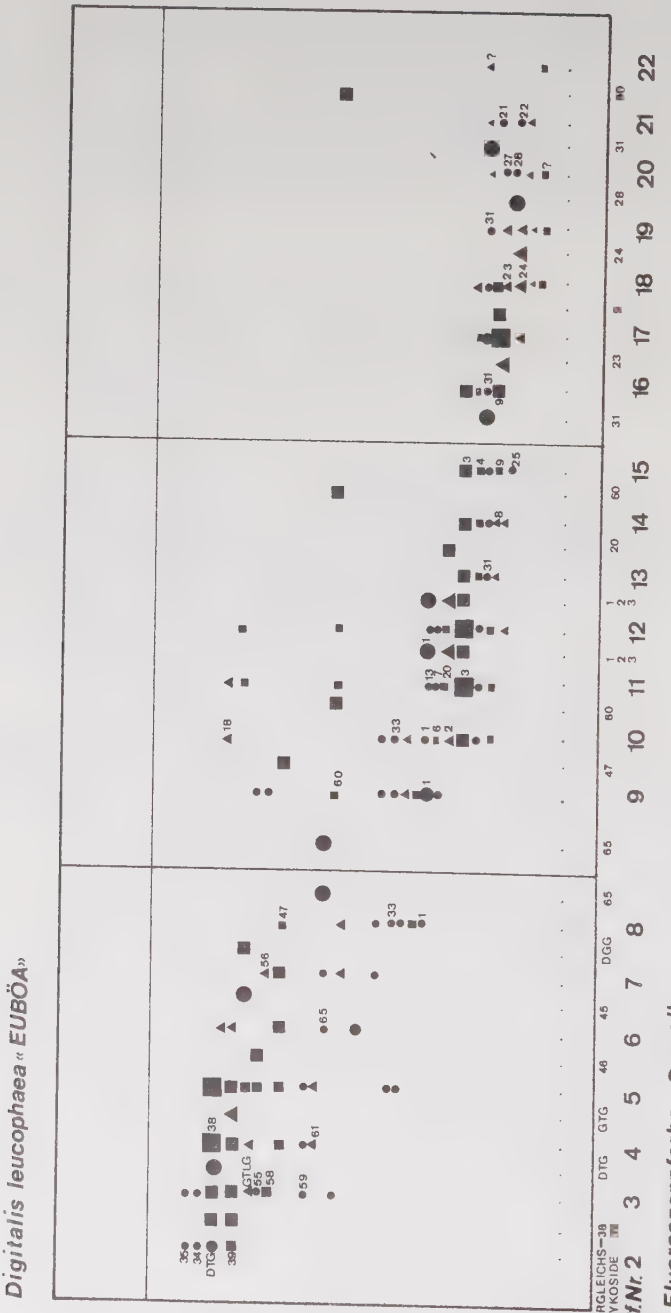
▲=B-Glykoside(grüne-grüngelbe Fluoreszenz)

■=C-Glykoside(blaue-stahlblaue Fluoreszenz)

Durch die unterschiedliche Größe der Glykosidsymbole wurde das quantitative Verhältnis der in einer Säulenfraktion gefundenen Glykoside zueinander wiedergegeben.

Der Seite mit der Darstellung der DC-Platten ist eine Seite mit Erklärungen nachgestellt worden.

Schematische Darstellung des Glykosidmusters der aus Samenmaterial der Insel Euböa kultivierten Digitalis leucophaea.Dargestellt im Maßstab 1:2 nach DC-Platten des Fließmittelsystems:Methyläthylketon/wassergesättigt.



Erklärung zur schematischen Darstellung der Vorseite:

Dargestellt ist die dünnschichtchromatographische Übersicht des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea,die aus dem Samenmaterial der Pflanzen des Standortes auf Euböa kultiviert worden waren.

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)
FLIESSMITTEL:Methyläthylketon
5,4% Wasser(NOVER 1969)
TEMPERATUR:21°C
LUFTFEUCHTIGKEIT:52%
FRONT:15cm
LAUFZEIT:110 Minuten
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz
AUSWERTUNG:UV-Licht 360nm

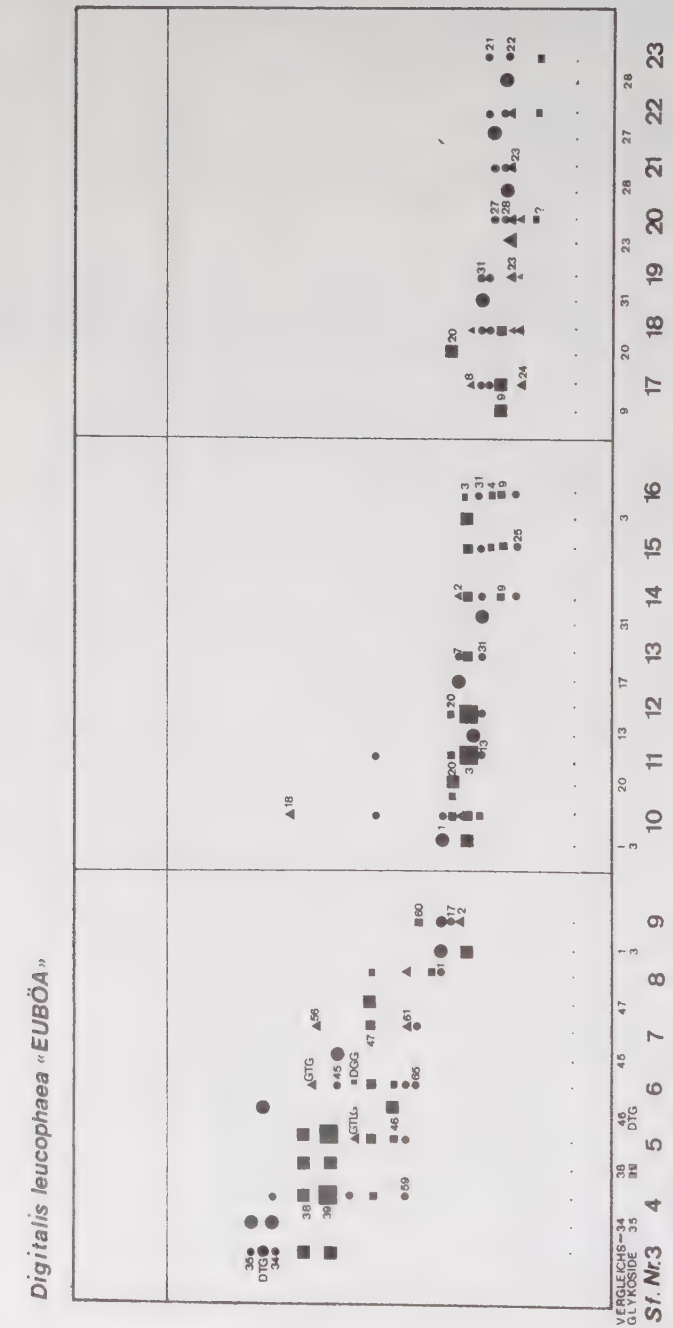
Aufgetragen mit der Mikropipette Microcaps Drummond wurden punktförmig jeweils 20µl der Säulenfraktionslösungen Nr.2 bis Nr.22 der Digitalis leucophaea.2µl einer Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration wurden zwischen den Säulenfraktionen als Leitglykosid aufgetragen.

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

α+βAcetyldigitoxin(34+35)
α+βAcetyldigoxin(38+39)
Digitoxigenin(Dtg)
Gitoxigenin(Gtg)
Gitoxin(46)
Digitoxin(45)
Digoxigenin(Dgg)
Digitoxigenin-gluco-methylosid(65)
Digoxin(47)
Strospesid(60)
Lanatosid A+B+C(1+2+3)
Glucolanadoxin(20)
Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid(31)
Digitalinum verum(23)
Desacetyl-lanatosid C(9)
Neo-digitalinum verum(24)
Neo-glucodigifucosid(28)

Die Auswahl der Leitglykoside richtete sich nach den Ergebnissen,die bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie der Digitalis leucophaea Untersuchung der Athos Standorte erhalten worden waren.
Da die Front auf einheitlich 15cm bei gleichen Versuchsbedingungen festgelegt worden war,außerdem auf jeder Platte ein Leitglykosid der anderen Platte mitlief, konnten die Ergebnisse in Form des gesamten Glykosidmusters der Digitalis leucophaea Euböa bei diesem Fließmittelsystem nebeneinander dargestellt werden.

Schematische Darstellung des Glykosidmusters der aus Samenmaterial von der Insel Euböa kultivierten Digitalis leucophaea.Dargestellt im Maßstab 1:2 nach DC-Platten des Fließmittelsystems:Äthylacetat: Methanol:Wasser(75:10:7,5).



Erklärung zur schematischen Darstellung der Vorseite:

Dargestellt ist die dünnschichtchromatographische Übersicht des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea,die aus dem Samenmaterial der Pflanzen des Standortes auf Euböa kultiviert worden waren.

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)
FLIESSMITTEL:Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

TEMPERATUR:22°C
LUFTFEUCHTIGKEIT: 49%
FRONT:15cm
LAUFZEIT:105 Minuten
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz
AUSWERTUNG:UV-Licht 360nm

Aufgetragen mit der Mikropipette Microcaps Drummond wurden punktförmig jeweils 20µl der Säulenfraktionslösungen Nr.3 bis Nr.23 der Digitalis leucophaea.2µl einer Vergleichsglykosidlösung bekannter Konzentration wurden zwischen den Säulenfraktionslösungen als Leitglykosid aufgetragen.

An Vergleichsglykosidlösungen wurden aufgetragen:

α+β Acetyldigitoxin(34+35)
α+β Acetyldigoxin(38+39)
Digitoxigenin(Dtg)
Gitoxin(46)
Digitoxin(45)
Digoxin(47)
Lanatosid A+B+C(1+2+3)
Gluco-lanadoxin(20)
Gluco-digitoxigenin-bisdigitoxosid(13)
Gluco-evatromonosid(17)
Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid(31)
Desacetyl-lanatosid C(9)
Digitalinum verum(23)
Neo-glucodigifucosid(28)
Glucodigifucosid(27)

Die Auswahl der Leitglykoside richtete sich nach den Ergebnissen,die bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie der Digitalis leucophaea Untersuchung der Athos Standorte erhalten worden waren.
Da die Front auf einheitlich 15cm bei gleichen Versuchsbedingungen festgelegt worden war,außerdem auf jeder Platte ein Leitglykosid der anderen Platte mitlief, konnten die Ergebnisse in Form des gesamten Glykosidmusters der Digitalis leucophaea Euböa bei diesem Fließmittelsystem nebeneinander dargestellt werden.

WEITERE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER "EUBÖA-" SÄULENFRAKTIONEN:

Nachdem die Untersuchung mit den universal eingesetzten Fließmittelsystemen beendet und der erste Eindruck über das qualitative und grob quantitative Glykosidmuster erhalten worden war, wurden die einzelnen Säulenfraktionen mit spezifischeren Fließmittelsystemen untersucht. Dadurch wurde die quantitative Bestimmung der gefundenen Glykoside durch Abschätzen anhand der mitgelaufenen Vergleichsglykoside bekannter Konzentration erleichtert.

Es kamen zum Einsatz:
für die Säulenfraktionen 3 bis 6:
Xylol 1
Methyläthylketon 1
auf Formamid/Aceton imprägnierten Platten,

für die Säulenfraktionen 7 und 8:
Cyclohexan 49
Aceton 49
Eisessig 2,

für die Säulenfraktionen 9 bis 14:
Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

und für die Säulenfraktionen 15 bis 23:
Äthylacetat 90
Äthanol 10
Wasser 5 auf Aceton/Wasser(3:2) imprägnierten Platten.

Das mit diesen Fließmittelsystemen erhaltene Glykosidmuster wurde bei den nachgestellten Glykosidkarten(s.S.87) wiedergegeben.

Bei der Untersuchung der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea des ursprünglichen Standortes Euböa fiel auf,daß die Schlußfraktionen Nr.20 bis Nr.24 sehr arm an Glykosiden waren. Jedes der eingesetzten Fließmittelsysteme erbrachte bei diesen Säulenfraktionen das gleiche Ergebnis.Außer den Glykosiden Odorobiosid G(21),Neo-odorobiosid G(22), Digitalinum verum(23),die noch in Spuren zu verzeichnen waren,konnten nur noch Spuren von Glucodigifucosid(27) und Neo-glucodigifucosid(28) vermerkt werden.Hingegen zeigten alle Platten nach der Detektion unter UV-Licht bei 360nm in diesen Säulenfraktionen grau-bläulich verwaschene Schlieren im unteren Rf-Bereich(Rf-Wert bis 0,15).Hier konnte nicht weiter identifiziert werden.Es dürfte sich weitestgehend um das Auftreten von Ballaststoffen gehandelt haben.

V.BEURTEILUNG DER METHODE:

1.)Allgemeine Verwendbarkeit und Vorteile der dünnschichtchromatographischen Untersuchungmethode der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea Blattextrakte.

Die Dünnschichtchromatographie als Einsatzmittel zur Untersuchung des Glykosidmusters der Säulenfraktionen der Digitalis leucophaea hat sich bei der Untersuchung aller drei Herkünfte als gut durchführbar erwiesen.

Der Vorteil lag einmal darin,daß mit sehr geringe Mengen an Säulenfraktions- und Vergleichsglykosi lösungen bei deutlichem Befund gearbeitet werden konnte.So reichten in der Regel 1µl bis 5µl der Säulenfraktionslösung und 1µl der Vergleichsglyko sidlösung völlig aus.

Es wurden leichter Glykoside erkannt,die selbst in nur geringen Mengen in einer Säulenfraktion enthalten waren (oder auch verschleppt worden waren) und die im Papierchromatogramm nur gefunden wurden,wenn mit großen Mengen Säulenfraktionslösung oder Vergleichsglykosidlösung gearbeitet wurde.In solchen Fällen erforderte die Papierchromatographie die fünf- bis zehnfache Menge an Probelösung.

Ebenfalls war der Einsatz an Fließmitteln sehr viel sparsamer. Die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Kammern wurden maximal mit 100 ml Fließmittel beschickt,während die große Glaskammer,die in der Papierchromatographie verwendet wurde,mindestens 300ml Fließmittel pro Lauf erforderte.

Darüber hinaus erbrachte die Untersuchung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie einen enormen Zeitgewinn.

Während die Untersuchung einer Säulenfraktion pro Papierchromatogramm mindestens 12 bis 24 Stunden alleine an Entwicklungszeit beanspruchte, war bei der Dünnschichtchromatographie mit vergleichbarem Ergebnis bereits nach durchschnittlich 2 Stunden zu rechnen.
Da gleichzeitig mit fünf Kammern dünnschichtchromatographisch gearbeitet wurde,war das Verhältnis auswertbarer DC-Platten zu Papierchromatogrammen etwa 20:1.

Es hat sich herausgestellt,daß für die Untersuchung des gesamten Glykosidmusters die Fließmittelsysteme,die für die frühen Säulenfraktionen (Nr.3 bis Nr.10)in der Papierchromatographie verwendet werden,wie etwa:

Xylol 1
Methyläthylketon 1
(formamid imprägniert)

mit gleich gutem Erfolg für diese Fraktionen in die Dünnschichtchromatographie übernommen werden konnten.
Gleiches gilt für Fließmittelsysteme,die KAISER(1966) benutzte,um Schwierigkeiten bei der Identifizierung einiger,sich ähnelnder Glykoside auszuräumen,zum Beispiel System 6 der Papierchromatographie:

Äthanol 10
Äthylacetat 90
Wasser 5
(Wasser/Aceton 2:3 imprägniert).

Für die Gesamtanalyse haben sich bei der geschilderten Methode:"Dünnschichtchromatographie mit Hilfe von Vergleichsglykosidlösungen bekannter Konzentration und quantitatives Abschätzen der Inhaltsstoffe durch Vergleich des Rf-Wertes,der Fleckengröße, Fluoreszenzfarbe und Fluoreszenzintensität" einige Fließmittel wie etwa:

Methyläthylketon
wassergesättigt

oder:

Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5

als besonders geeignet gezeigt.
Sie waren unabhängig vom Glykosidtyp universal für alle Säulenfraktionen anwendbar und konnten allgemein für die rasche Aufklärung zumindest über die qualitative Zusammensetzung des Glykosidmusters benutzt werden.Die Trennungsbreite dieser Systeme war an den Darstellungen der Übersichtschromatogramme(s.S.76+78) ersichtlich.Im Prinzip ist die Vollanalyse durch die Kombination: "Säulenchromatographische Trennung-Dünnschichtchromatographische Untersuchung" bei Digitalis Blattextrakten gut durchzuführen.Es konnten brauchbare Ergebnisse im Sinne der Klärung des Glykosidmusters von Digitalis leucophaea erbracht werden.

Neben der schnellen Orientierung über die qualitative und grob quantitative Beschaffenheit des Glykosidmusters bieten die universal eingesetzten Fließmittel einen weiteren Vorteil. Wenn,wie hier,Digitalis leucophaea Vertreter unterschiedlicher Standorte zu untersuchen sind, kann wie das Beispiel auf Seite 110 zeigt,sehr rasch und unaufwendig ein genereller qualitativer Unterschied der Glykosidmuster erkannt werden,der dann durch spezielle Fließmittel und durch Variation der Fließmittelsysteme aufgeschlüsselt werden kann.

Bei den hier untersuchten Digitalis leucophaea Vertretern dreier verschiedener Standorte konnten die Glykoside der Säulenfraktionen mit folgenden Fließmittelsystemen aufgeschlüsselt und für die quantitative Abschätzung besser dargestellt werden:

Säulenfraktionen Nr.3 bis Nr.6:
Methyläthylketon 1
Xylol 1
(Formamid/Aceton imprägnierte Platten);

Säulenfraktionen Nr.7 und Nr.8:
Cyclohexan 49
Aceton 49
Eisessig 2 ;

Säulenfraktionen Nr.9 bis Nr.14:
Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5 ;

Säulenfraktionen Nr.15 bis Nr.23:
Äthylacetat 90
Äthanol 10
Wasser 5
(Aceton/Wasser 3:2 imprägnierte Platten).

Das mit diesen Fließmittelsystemen erhaltene Glykosidmuster wird in den Glykosidkarten der Seiten 87 und 88 dargestellt.

Lagen bei diesen spezielleren Fließmittelsystemen die Rf-Werte unterschiedlicher Glykoside einer Säulenfraktion dennoch zu nahe beieinander, gab es alternativ die Möglichkeit, mit einem anderen unter den Fließmittelbeschreibungen aufgeführten System (s.S.48-51) weiter zu kommen.

2.)GLYKOSIDKARTEN ZUR DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die nachfolgenden Darstellungen zeigen in Analogie zu den Glykosidkarten bei KAISER(1966) das gesamte Glykosidmuster der dünnschichtchromatographisch untersuchten Vertreter der Digitalis leucophaea "Athos" und "Euböa".

Da die Vertreter der Digitalis leucophaea,die aus dem Samenmaterial der Athos Standorte kultiviert worden waren,sich im Glykosidmuster als fast identisch erwiesen,wurde das Glykosidmuster dieser Vertreter zusammengefaßt und in nur einer Darstellung wiedergegeben.

Es können die in den einzelnen Säulenfraktionen gefundenen Glykoside mit ihrem Rf-Wert beim jeweils verwendeten Fließmittelsystem entnommen werden.

Es wurde das qualitative Glykosidmuster dargestellt.

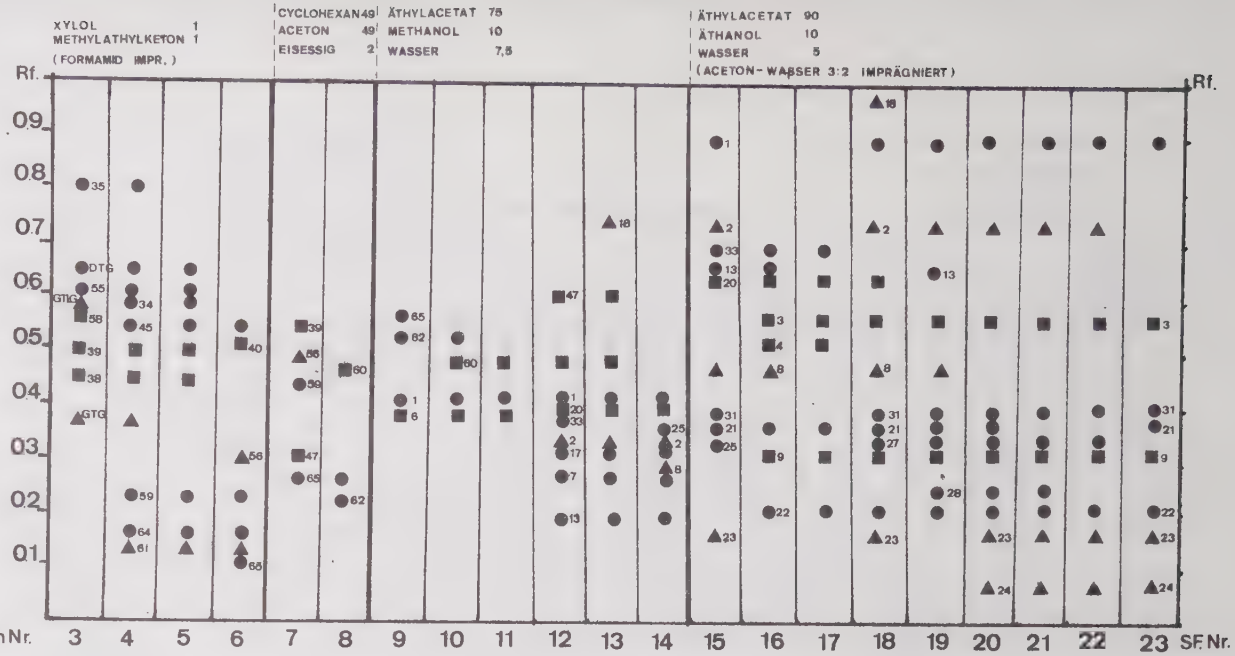
Die Nummern der Glykoside entsprechen denen in den Tabellen und den bei KAISER(1966) verwendeten.

Den Glykosiden wurden Symbole zugeordnet:

● =A-Glykoside(gelbe Fluoreszenz)

▲ =B-Glykoside(grüne-grüngelbe Fluoreszenz)

■ =C-Glykoside(blaue-stahlblaue Fluoreszenz)



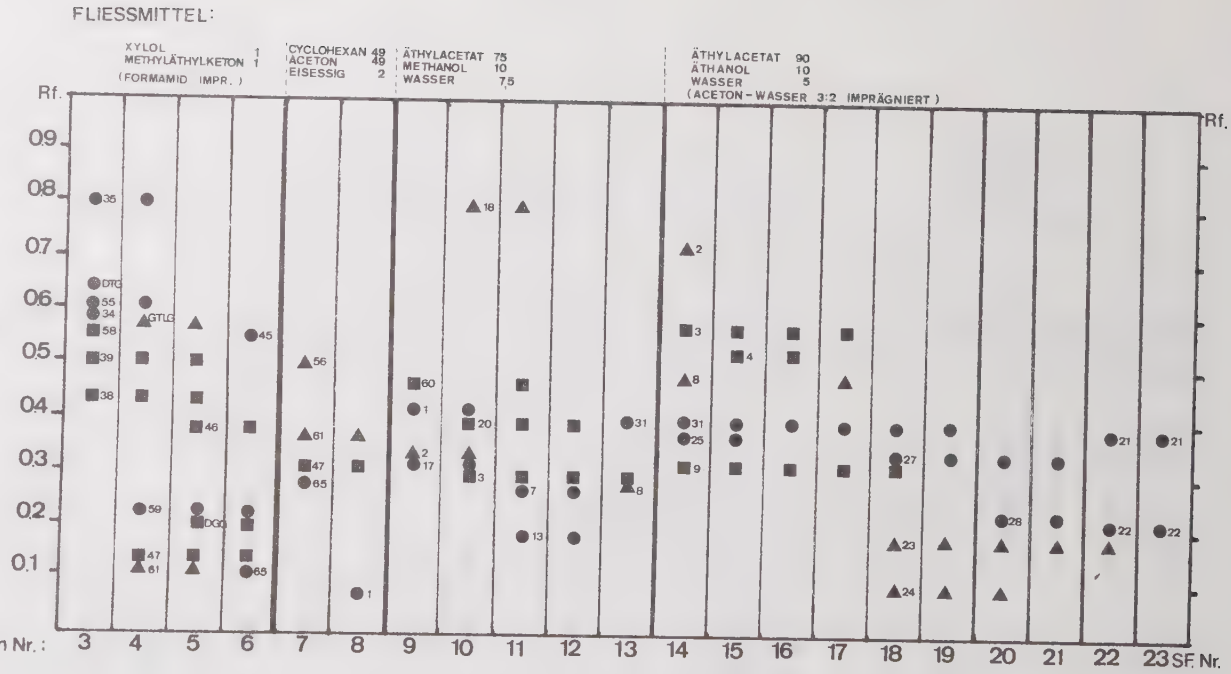
Gesamtübersicht des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea «ATHOS»

(DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE)

●= A-Glykoside

▲= B-Glykoside

■= C-Glykoside



Gesamtübersicht des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea «EUBÖA»

(DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE)

● = A-Glykoside

▲ = B-Glykoside

■ = C-Glykoside

V.BEURTEILUNG DER METHODE:

3.)Problematik der Dünnschichtchromatographie.

Für die qualitative Analyse mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie traf im wesentlichen die gleiche Problematik zu,die sich auch für die Papierchromatographie aufführen läßt.Hier wie dort boten sich auch die gleichen Lösungsmöglichkeiten an.

Die Rf-Werte ähnlicher Glykoside waren manchmal nahezu identisch und erschwerten eine eindeutige Aussage.Diese wurde dann möglich im Vergleich mit anderen Fließmittelsystemen oder nach Spaltungsreaktionen.MANNICH/SIEWERT (1942);SCHMUTZ/REICHSTEIN(1947);KUTTER/FAUCONNET(1959);KAISER(1966).

So wurden gute qualitative Ergebnisse erzielt. Da bei den Digitalis leucophaea Herkünften Nr.71 und Nr.77(Athos) zusätzlich papierchromatographisch gearbeitet wurde,kann der Schluß gezogen werden,daß die Dünnschichtchromatographie hier die Papierchromatographie ersetzen kann.

Bei der nach den vorhandenen Möglichkeiten angewendeten Methode,die quantitative Bestimmung der Glykoside über Versuche mit Vergleichsglykosiden in Konzentrationsreihen vorzunehmen,(Abschätzen unter UV-Detektion bei 360nm) muß mit einer durchschnittlichen Fehlerquote von +/-20%gerechnet werden.
In der Tabelle mit den quantitativen Angaben der gefundenen Glykoside sind einige Werte gekennzeichnet(*).Diese Werte wurden von Kaiser(Fa.Boehringer Mannheim) in einer gleichzeitigen Untersuchung des gleichen Blattextraktes durch Direktfluorimetrie ermittelt.Die eigenen Werte entsprachen den Werten,die nach dieser Methode erhalten worden waren,innerhalb der angegebenen Fehlerquote.

Die hier beschriebene Methode der Glykosidbestimmung konnte mit den aufgeführten "Universalfließmitteln" mit ausreichender Genauigkeit angewendet werden.
Bei Einsatz der Direktfluorimetrie zur genaueren quantitativen Glykosidbestimmung müßte die Quantifizierung der meisten Cardenolide möglich sein, soweit Vergleichssubstanzen vorhanden sind und jeweils mit Fließmittelsystemen gearbeitet wird, die eine optimale Trennung der Glykoside einer Säulenfraktion erbringen.
Dadurch würde zwar ein Teil der Standartisierung verloren gehen, wie sie hier für die qualitative und grob quantitative Bestimmung des Glykosidmusters durch den Einsatz von nur zwei Fließmittelsystemen, nämlich: Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5
und
Methyläthylketon
wassergesättigt,
erreicht worden war. Es müßte wie in der Papierchromatographie mit unterschiedlichsten Fließmittelsystemen gearbeitet werden. Der im Vergleich zur Papierchromatographie dennoch geringere Arbeitsaufwand, die enorme Sparsamkeit an Chemikalien und der große Zeitgewinn rechtfertigen voll den Einsatz der Dünnschichtchromatographie.

VI.TABELLE:FLIESSMITTELSYSTEME UND RF-WERTE.

Die folgende Tabelle enthält die im experimentellen Teil der Dünnschicht-chromatographischen Untersuchung der Digitalis leucophaea erhaltenen Rf-Werte der wichtigsten Fließmittel-systeme.

Alle Rf-Werte wurden bei einer Raum-temperatur von 20°C(+/- 2°C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% (+/-5%) erhalten.

Der angegebene Wert ist ein Mittelwert. Er ergab sich aus etwa 20 Einzelwerten mit dem jeweiligen Fließmittelsystem.

Namen und Nummern der Glykoside ent-sprechen denen der Kaiser-Literatur.

TAFELLE:Rf-Werte der DC-Versuche mit verschiedenen Fließmittelsystemen.

Nr.im Versuch und nach Kaiser	Name des Vergleichsglykosids	Fluoreszenz farbe	"CAE" Sf.Nr. 3 bis 8	"MÄK" 1 Xylol 1 Foa.impr. Sf.Nr. 3-10	Äthylacetat 9 Äthanol 1 Wasser 0,5 Aceton/Wasser imprägniert Sf.Nr.20-23	"MÄK"/H_2O ges. alle Säulenfr. Athos-Euböa Standort		Äthylacetat7 Methanol 1 Wasser 7, Athos-Euböa Standort alle Säulenf	
1	Lanatosid A	gelb	0,075		0,9	0,39	0,32	0,41	0,37
2	Lanatosid B	grün			0,74	0,34	0,28	0,33	0,32
3	Lanatosid C	blau			0,57	0,33	0,28	0,3	0,22
7	Purpureaglykosid A	gelb				0,28		0,27	0,27
8	Purpureaglykosid B	blaugrau			0,47	0,24	0,18	0,3	0,23
9	Desacetyl-lanatosid C	blau			0,32	0,22	0,16	0,36	0,32
16	Gluco-digitoxigenin-bis digitoxosid	gelb				0,29		0,19	
17	Gluco-evatromonosid	gelb				0,35	0,26	0,32	0,31
18	Gluco-gitorosid	blau-grün				0,83	0,8	0,75	0,71
20	Gluco-lanadoxin	blau-hellblau			0,64	0,35	0,27	0,4	0,36
21	Odorobiosid G	gelb			0,38	0,24	0,18	0,36	0,24
22	Neo-odorobiosid G	gelb			0,22	0,22	0,14	0,32	0,19
23	Digitalinum verum	blaugrün			0,17	0,21	0,14	0,30	0,17
24	Neo-digitalinum verum	blaugrün			0,08	0,16	0,11	0,25	0,14
25	Glucoverodoxin	blaugrün			0,36	0,26	0,18	0,25	0,24
27	Glucodigifucosid	gelb			0,33	0,24	0,15	0,36	0,24
28	Neo-glucodigifucosid	gelb			0,24	0,19	0,15	0,31	0,2

TABELLE:Rf-Werte der DC-Versuche mit verschiedenen Fließmittelsystemen.

Nr.im Versuch und nach Kaiser	Name des Vergleichsglykosids	Fluoreszenz-farbe	"CAE" Sf.Nr. 3 bis 8	"MÄK" 1 Xylol 1 Foa.impr. Sf.Nr. 3-10	Äthylacetat 9 Äthanol 1 Wasser 0,5 Aceton/Wasser imprägniert Sf.Nr.20-23	"MÄK/H_2Oges. alle Säulenfr. Athos-Euböa Standort		Äthylacetat75 Methanol 10 Wasser 7,5 Athos-Euböa Standort alle Säulenfr	
31	Gluco-digitoxigenin-gluco methylosid	gelb			0,4	0,26	0,20	0,41	0,24
33	Digitoxigeninglucosid	gelb				0,45	0,37	0,38	0,37
34	α-Acetyl-digitoxin	gelb	0,56	0,58		0,82	0,80	0,76	0,77
35	β-Acetyl-digitoxin	gelb	0,59	0,80		0,93	0,92	0,90	
36	α-Acetyl-gitoxin	grünblau	0,54	0,60		0,88		0,82	
38	α-Acetyl-digoxin	blau	0,45	0,44		0,83	0,84	0,70	0,70
39	ß-Acetyl-digoxin	blau	0,53	0,50		0,87	0,88	0,76	0,76
43	α-Acetyl-gitaloxin	blaugrün	0,56	0,61		0,86	0,88	0,82	0,82
45	Digitoxin	gelb	0,56	0,55		0,82	0,80	0,65	0,70
46	Gitoxin	blaugrün				0,77	0,75	0,71	0,62
47	Digoxin	blau	0,3	0,14		0,73	0,73	0,63	0,58
48	Neodigoxin	blau				0,63	0,62	0,40	0,48
49	Diginatin	blau	0,2	0,04		0,64	0,65	0,40	0,48
50	Gitaloxin	blau	0,48			0,82	0,81	0,69	0,70
52	Gitoxigenin-bis-digitoxosid	grünblau	0,43			0,81	0,78	0,62	0,64
53	Digoxigenin-bis digitoxosid	blau	0,33			0,73	0,75	0,53	0,59
55	Evatromonosid	gelb	0,6	0,59		0,86	0,86	0,83	0,80

TABELLE:Rf-Werte der DC-Versuche mit verschiedenen Fließmittelsystemen.

Nr.im Versuch und nach Kaiser	Name des Herzglykosids	Fluoreszenz-Farbe	"CAE" Sf.Nr. 3-8	"MÄK" 1 Xylol 1 Foa.impr. Sf.Nr. 3-10	"MÄK"/H_2O gesättigt alle Säulenfraktionen ATHOS Standort	EUBÖA	Äthylacetat 75 Methanol 10 Wasser 7,5 alle Säulenfrakt. ATHOS	EUBÖA
56	Gitorosid	grün	0,49	0,30	0,82	0,81	0,71	0,70
57	Digoxigenin-digitoxosid	blau	0,38	0,15	0,76	0,78	0,63	0,66
58	Lanadoxin	stahlblau		0,55	0,86	0,86	0,83	0,80
59	Odorosid H	gelb	0,44	0,23	0,69	0,66	0,56	0,57
60	Strospesid	stahlblau	0,25	0,05	0,69	0,66	0,46	0,47
61	Verodoxin	grünblau	0,35	0,13	0,72	0,68	0,56	0,60
65	Digitoxigenin-gluco-methylosid	gelb	0,28	0,11	0,66	0,62	0,58	0,58
67	Neo-digoxosid	blau			0,73		0,53	0,53
68	16-Acetylgitoxin	grün			0,83		0,68	
Dtg	Digitoxigenin	gelb	0,61	0,64	0,86	0,88	0,85	0,85
Gtg	Gitoxigenin	grünblau	0,51	0,37	0,81	0,82	0,85	0,75
Dgg	Digoxigenin	blau	0,42	0,21	0,78	0,80	0,68	0,68
Gtlg	Gitaloxigenin	grün-blaugrau	0,58	0,56	0,86	0,88	0,85	0,84

VII. SCHLUSSTABELLE:

Die Tabelle enthält die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Säulenfraktionen. Die Werte entstanden durch Abschätzen des Glykosidgehalts der jeweiligen Säulenfraktion im Vergleich des Rf-Wertes, der Fleckengröße, Fluoreszenzfarbe und Fluoreszenzintensität mit den mitgelaufenen Referenzsubstanzen (Vergleichsglykosidlösungen), die in bekannter Konzentration aufgetragen worden waren.

Die in der Tabelle besonders gekennzeichneten Werte(*) wurden von Kaiser(Fa. Boehringer Mannheim) bei einer gleichzeitigen Untersuchung der gleichen Digitalis leucophaea Blattextrakte mittels DC-Direktfluorimetrie gesichert.

Alle Angaben erfolgen in mg auf 100g Blattmaterial umgerechnet.

Zur Anschauung wurden in die Tabelle quantitative Wertangaben für Digitalis lanata Blattextrakt eingearbeitet. Diese Werte stammen aus den Untersuchungen von KAISER(1966). Sie sollen nur zur anschaulichen Orientierung dienen. Der Frequenzbereich dieser Angaben kam zustande, da es sich um Ergebnisse der Untersuchung zahlreicher Exemplare einjähriger Pflanzen aus Anbau, Züchtungsversuchen und Wildwuchs handelt, die im Laufe von mehreren Jahren ermittelt wurden. Die eigene Untersuchung erfolgte an Pflanzen nur einer Population dreier verschiedener Standorte.

SCHLUSSTABELLE: Ergebnisse der quantitativen Auswertung. Die mit Stern(*) gekennzeichneten Werte wurden von Kaiser (Fa. Boehringer Mannheim) mittels Direktfluorimetrie am gleichen Untersuchungsmaterial gesichert.

Glykosid Nr. nach Kaiser	Name des Glykosids	D. lanata (Kaiser)	Digitalis leucophaea (Athos) Nr. 71	Nr. 77	(Euböa)
1	Lanatosid A	80-240	160*	170*	15*
2	Lanatosid B	10-50	35	40	25
3	Lanatosid C	80-240	220*	220*	340*
4	Neo-lanatosid C	2-10			
5	Lanatosid D	2-10			
6	Lanatosid E	5-20	30*	30*	10*
7	Purpureaglykosid A	3-10	30	30	10
8	Purpureaglykosid B	1-5	30	30	5
9	Desacetyl-lanatosid C	5-20	25	25	40
10	Neo-desacetyl-lanatosid C	0,5-2			
11	Desacetyl-lanatosid D	<1			
12	Glucogitaloxin	1-3		1	
13	Gluco-digitoxigenin-bisdigitoxosid	2-10	30	30	20
14	Gluco-gitoxigenin-bisdigitoxosid				
15	Gluco-digoxigenin-bisdigitoxosid	15-50			
16	Gluco-gitaloxigenin-bisdigitoxosid				
17	Gluco-evatromonosid	20-60	100	80	30
18	Glucogitorosid	20-120	2	1	Spur
19	Gluco-digoxigenin-digitoxosid	5-10			
[illegible]	Gluco-lanadoxin	20-120	110	130	30

TABELLE:Ergebnisse der quantitativen Auswertung.

Glykosid Nr.nach Kaiser	Name des Glykosids	D.lanata (Kaiser)	Digitalis leucophaea (Athos) Nr.71	Nr.77	(Euböa)
21	Odorobiosid G	1-3	5	5	5
22	Neo-odorobiosid G	3-10	30	25	20
23	Digitalinum verum	20-120	20	30	30
24	Neo-digitalinum verum	5-15	15	15	15
25	Glucoverodoxin	20-100	30	30	20
26	Neo-glucoverodoxin	2-10	5	5	20
27	Glucodigifucosid	10-30	15	15	15
28	Neo-glucodigifucosid	20-50	15	15	15
29	Glucogitofucosid	5-20	5	5	
30	Gluco-digitoxigenin-allomethylosid	5-10			
31	Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid	30-60	30	25	30
32	Gluco-digitoxigenin-acetylglucomethylosid	1-3	3	5	-
33	Digitoxigenin-glucosid	1-3	5	7	-
34/35	Acetyldigitoxinα/β	5-30	25*	40*	5*
36/37	Acetylgitoxinα/β	1-5			
38-40	Acetyldigoxin$\alpha/\beta/\gamma$	5-30	23*	30*	80*
41	Neo-acetyldigoxin	0,5			
42	Acetyldiginatin	0,5			
43/44	Acetylgitaloxinα/β	1-2	5	5	-

TABELLE:Ergebnisse der quantitativen Auswertung.

Glykosid Nr.nach Kaiser	Name des Glykosids	D.lanata (Kaiser)	Digitalis leucoph. (Athos) Nr.71	Nr.77	(Euböa)
45	Digitoxin	5-20	Spur*	3*	Spur*
46	Gitoxin	1-5	5	3	2
47	Digoxin	4-20	5*	10*	35*
48	Neodigoxin	<0,5	Spur	Spur	-
49	Diginatin	<0,5	Spur	Spur	Spur
50	Gitaloxin	0,5	Spur	-	-
51	Digitoxigenin-bis-digitoxosid	0,5			
52	Gitoxigenin-bis-digitoxosid	-			1
53	Digoxigenin-bis-digitoxosid	0,5-2			1
54	Gitaloxigenin-bis-digitoxosid	-			
55	Evatromonosid	3-5	15	10	2
56	Gitorosid	5-20	3	-	2
57	Digoxigenin-digitoxosid	<0,5	-	-	1
58	Lanadoxin	5-20	5	5	5
59	Odorosid H	0,5	8	10	10
60	Strospesid	5-20	30	25	10
61	Verodoxin	5-10	8	10	10
62	Digiprosid	1-3	3	3	-
63	Gitoxigenin-fucosid	0,5			
64	Digitoxigenin-allo-methylosid	<0,5	Spur	Spur	-

TABELLE:Ergebnisse der quantitativen Auswertung.

Glykosid Nr. nach Kaiser	Name des Glykosids	D.lanata (Kaiser)	Digitalis leucoph. (Athos) Nr.71	(Euböa) Nr.77	
65	Digitoxigenin-gluco methylosid	3-10	30	30	15
	Digitoxigenin(Dtg)	5-20	30	30	20
	Gitoxigenin (Gtg)	0,5-2	Spur	Spur	1,5
	Digoxigenin (Dgg)	0,5-2	Spur	Spur	1
	Gitaloxigenin(Gtlg)	0,1-1	Spur	-	Spur

D.)BEURTEILUNG DER HERKÜNFTE DER UNTERSUCHTEN DIGITALIS LEUCOPHAEA.

1.)Einzelbeobachtungen zu den Pflanzen,die aus dem Samenmaterial der Digitalis leucophaea Populationen am Berge Athos kultiviert worden waren.Vergleich der beiden Athos Standorte.

Im Vergleich erwiesen sich die beiden Digitalis leucophaea Vertreter,deren ursprünglicher Standort am Berge Athos zu finden war,als nahezu gleichwertig.

In den Pflanzen Nr.71(Standort Nr.30.689-20) fanden sich einige Glykoside in Spuren deutlicher. Das war der Fall beim Gitaloxin(50) und beim Gitaloxigenin(Gtlg).Der Unterschied war nur an der Fluoreszenzintensität ersichtlich und konnte nicht in Mengenangaben gemacht werden.

Die Pflanzen Nr.77(Standort Nr.30.704-24) zeigten einen etwas höheren Gesamtglykosidgehalt.So war der Gehalt an Lanatosid A um 10mg höher(Angaben berechnet auf 100g Blattmaterial)und der Gehalt an Digoxin(47) war mit 10mg doppelt so hoch.Auch der Gehalt an Acetyldigoxin(34) wies 15mg mehr und damit fast die doppelte Menge als die auf,die in der Digitalis leucophaea Nr.71 gefunden worden war.

In den Chromatogrammen einiger Fraktionen fanden sich schwache Fluoreszenzen.Diese wiesen auf Inhaltsstoffe hin,die allerdings nur in äußerst geringen Spuren enthalten sein konnten.Sie waren mit den gegebenen Untersuchungsmöglichkeiten nicht weiter erfaßbar.

Auffallend war bei den späten Säulenfraktionen (Nr.21 bis Nr.23) ein kleiner konzentrierter Fleck mit tiefblauer fast violetter Fluoreszenz,die sich erst nach einigen Tagen deutlich herausbildete,bei lagernden Platten allerdings im Vergleich zu den Flecken der C-Glykoside schneller an Fluoreszenzstärke und Intensität wieder nachließ.Dieser Fleck hatte den sehr kleinen Rf-Wert von 0,05 und wurde nur bei den Fließmittelsystemen auf Äthylacetatbasis gefunden.(So bei:Äthylacetat:Methanol:Wasser 75:10:7,5 und bei:Äthylacetat:Äthanol:Wasser 90:10:5 nach Kaiser)Er konnte nicht geklärt werden.

2.)Vergleich des Glykosidmusters der Pflanzen, die aus dem Samenmaterial der Digitalis leucophaea Population vom Berge Athos kultiviert worden waren,mit dem Glykosidmuster der Digitalis lanata nach den Kaiser Untersuchungen.

Digitalis leucophaea "Athos" zeigte in den hier untersuchten Pflanzenvertretern ein Glykosidmuster,das dem der Digitalis lanata sehr nahe stand.Abweichungen gab es nur an wenigen Stellen und meistens waren sie für eine Gesamtbeurteilung unwesentlich.

Kaiser ermittelte beispielsweise für Digitalis lanata 20-120mg (auf 100g Blattmaterial) an Glucogitorosid(18).Der bei Digitalis leucophaea gefundene Gehalt war mit 2mg vergleichsweise sehr niedrig.Er beträgt nur 10% der unteren Frequenzangabe des Digitalis lanata Wertes bei Kaiser.(Die Gehaltsangaben in Frequenzen bei Kaiser entstanden,da viele unterschiedliche Digitalis lanata Vertreter über mehrere Jahre ausgewertet wurden,während hier nur Pflanzenvertreter einer Population von drei verschiedenen Standorten untersucht wurden!)

Entsprechend wurde auch weniger Gitorosid(56) gefunden,nämlich nur 3mg berechnet auf 100g Blattmaterial.
An dieser Stelle könnte sich das Glykosidmuster zugunsten von Evatromonosid(55) und Glucoevatromonosid(17) verschoben haben.
Von Glucoevatromonosid(17) war in Digitalis leucophaea mit 100mg mehr zu finden,als für Digitalis lanata mit 20-60mg angegeben war.
Gleiches traf für Evatromonosid (55) zu.
Auch davon wurde in Digitalis leucophaea mit 15mg mehr gefunden,als für Digitalis lanata mit 3-5mg angegeben war.

Bei den Glykosiden:Gitorosid(56)
Glucogitorosid(18)
Evatromonosid(55)
Glucoevatromonosid(17)
erinnerte die Verschiebung des Glykosidmusters ein wenig an das Glykosidmuster der Digitalis ferruginea.KAISER(1966)

Von den Bis-glykosiden konnte nur Glucodigitoxigenin-bis-digitoxosid(31)gefunden werden. Mit 25mg(auf 100g Blattmaterial) war der Befund allerdings deutlich.

Der Gehalt an Digitoxigenin(45) war in allen drei Vertretern der Digitalis leucophaea sehr niedrig.Digitoxigenin(45) wurde in Spuren bis zu 3mg gefunden.Damit bewegte sich der Gehalt an diesem Glykosid an der unteren Frequenzgrenze,die bei Kaiser für Digitalis lanata mit 5-20mg angegeben ist.

Grundsätzliche und wesentliche Unterschiede zum Glykosidmuster der Digitalis lanata konnten nicht verzeichnet werden.

Auch die Digitalis leucophaea des ursprünglichen Standortes auf der Insel Euböa zeigte im Vergleich zur Digitalis lanata keine wesentlichen Unterschiede im Glykosidmuster.Alle Ergebnisse lagen innerhalb der Variationsbreite des Digitalis lanata Spektrums.
Eine Überraschung ergab erst der Vergleich und die Gegenüberstellung der Glykosidmuster der Digitalis leucophaea "Athos" mit dem Glykosidmuster der Digitalis leucophaea "Euböa".Dieser Vergleich mit seinen überraschenden Ergebnissen wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.)VERGLEICH DES GLYKOSIDMUSTERS DER DIGITALIS LEUCOPHAEA "ATHOS" MIT DEM GLYKOSIDMUSTER DER DIGITALIS LEUCOPHAEA "EUBÖA".

Während der Vergleich zur Digitalis lanata bei allen dreien der hier untersuchten Digitalis leucophaea Vertretern eine große Übereinstimmung im Glykosidmuster erbrachte,ergab sich beim Vergleich der drei Digitalis leucophaea Vertreter untereinander erstaunlicher Weise ein großer Unterschied in der quantitativen Zusammensetzung des Glykosidmusters.

Bei den untersuchten Vertretern der Digitalis leucophaea,die aus dem Samenmaterial von der Insel Euböa kultiviert worden waren,zeigte sich das Glykosidmuster eindeutig zugunsten der C-Glykoside verschoben.

Neben 340mg Lanatosid C(3) war der Gehalt an Lanatosid A(1) mit 15mg pro 100g Blattmaterial bei der "Euböa-Digitalis" sehr gering.Bei den "Athos-Vertretern" wurden 220mg Lanatosid C(3) neben immerhin 170mg Lanatosid A(1) gefunden.

Auch Desacetyllanatosid C(9) zeigte in den Euböapflanzen mit 40mg/100g Blattmaterial einen wesentlich größeren Gehalt,als mit 25mg pro 100g Blattmaterial in den Vertretern der ursprünglichen Athosstandorte zu verzeichnen war.

Digoxin(47) wurde mit 35mg pro 100g Blattmaterial in der Digitalis leucophaea"Euböa" in der über dreifachen Menge gegenüber der Digitalis leucophaea"Athos" gefunden.Hier waren es 10mg pro 100g Blattmaterial.

Der Digitoxingehalt(45) hingegen erwies sich in allen drei Digitalis leucophaea Vertretern als ziemlich gleichwertig.Von diesem Glykosid wurden Spuren bis zu 3mg pro 100g Blattmaterial gefunden.

Auch die 6-Desoxyhexosen(Digitaloside,Fucoside, Glucomethyloside etc.) zusammen betrachtet, ließen zwischen den Pflanzenvertretern der unterschiedlichen Standorte keinen signifikanten Unterschied erkennen.

Die eindeutigen Unterschiede betrafen speziell die Digitoxoside.Hier war erstaunlich,wie sehr unterschiedlich das Glykosidmuster der aus Samenmaterial der Athospflanzen kultivierten Digitalis leucophaea zu dem der vom Euböastandort kultivierten Pflanzen war.Um diese Unterschiede deutlich zu machen,wurden in den folgenden Tabellen die A-,B- und C-Digitoxoside zusammengefaßt und aufaddiert.

TABELLE DER A-DIGITOXOSIDE:Angabe in mg/100g Blattmaterial

GLYKOSID	NR.	Digitalis leucophaea kultiviert aus Samenmaterial von Nr.71 ATHOS	Nr.77 EUBÖA
Lanatosid A	1	160	170	15
Purpureaglykosid A	7	30	30	10
Gluco-digitoxigenin-bisdigitoxosid	13	30	30	20
Gluco evatromonosid	17	100	80	30
α+βAcetyldigitoxin	34+35*	25	40	5
Evatromonosid	55	15	10	2
Digitoxin	45	3	1	1
		363	361	83

Die Digitalis leucophaea Vertreter der ursprünglichen Athosstandorte enthielten das 4;4fache an A-Digitoxosiden wie die Pflanzenvertreter des ursprünglichen Euböastandortes.
Der hohe Gehalt an A-Digitoxosiden wurde in erster Linie durch den Gehalt an Lanatosid A(1),Gluco evatromonosid(17) und Evatromonosid(55) bedingt,der in den "Athos-Pflanzen" um vieles höher war.

TABELLE DER B-DIGITOXOSIDE:

GLYKOSID	NR.	Digitalis leucophaea kultiviert aus Samenmaterial von Nr.71 ATHOS	Nr.77 EUBÖA
Lanatosid B	2	35	40	25
Lanatosid E	6	30	25	10
Purpureaglykosid B	8	30	30	5
Glucolanadoxin	20	110	130	30
α+βAcetylgitaloxin	43/44	5	5	-
Gitoxin	46	5	3	2
Gitorosid	56	3	-	2
Lanadoxin	58	5	5	5
		223	238	89

Die Digitalis leucophaea Vertreter der ursprünglichen Athosstandorte enthielten das 2,5 fache an B-Digitoxosiden wie die Pflanzenvertreter des ursprünglichen Euböastandortes.
Bei den B-Digitoxosiden wird der hohe Gehalt der "Athos-Pflanzen" durch den großen Anteil von Glucolanadoxin(20) charakterisierend geprägt.Allein dieses Glykosid fand sich mit durchschnittlich 120mg pro 100g Blattmaterial in der vierfachen Menge gegenüber den Pflanzenvertretern des ursprünglichen Standortes auf Euböa.Letztere enthielten lediglich 30mg auf 100g Blattmaterial vom Glucolanadoxin.

Der Frequenzbereich dieses Glykosides betrug bei Kaiser 20-120mg/100g Blattmaterial für Digitalis lanata.Hier konnte erneut gesehen werden,daß der eigentliche Unterschied nicht zum Glykosidmuster der Digitalis lanata, sondern im Vergleich des Glykosidmusters der"Athos-" zu dem der "Euböa-Standorte" liegt.

TABELLE DER C-DIGITOXOSIDE:Angabe in mg/100g Blattmaterial

GLYKOSID	NR.	Digitalis leucophaea kultiviert aus Samenmaterial von Nr.71 ATHOS	Nr.77 ATHOS	EUBÖA
Lanatosid C	3	220	220	340
Desacetyllanatosid C	9	25	25	40
α+β+γAcetyldigoxin	38-40	23	30	80
Digoxin	47	5	10	35
		273	285	495

Die Tabelle der C-Digitoxoside zeigt das entgegengesetzte Bild im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Tabellen. Hier erwiesen sich die Vertreter der Digitalis leucophaea, die aus dem Samenmaterial des Euböastandortes kultiviert worden waren,als gehaltvoller.So wurde mit 340mg pro 100g Blattmaterial deutlich mehr Lanatosid C(3) gefunden als mit 220mg bei den Pflanzenvertretern der ursprünglichen Athosstandorte.

Der Gehalt an Digoxin(47) war mit 35mg pro 100g Blattmaterial in den "Euböa-Pflanzen" gegenüber durchschnittlich 7,5mg pro 100g Blattmaterial in den "Athos-Pflanzen" fast fünffach so hoch.Insgesamt enthielten die Digitalis leucophaea Vertreter des ursprünglichen Euböastandortes das 1,7 fache an C-Digitoxosiden wie die Pflanzenvertreter der ursprünglichen Athosstandorte.

Die Summe der Digitoxoside ergab folgendes Verhältnis:
Vertreter der Digitalis leucophaea,die aus Samenmaterial der Standorte auf

Athos Nr.71 (30.689-20	Athos Nr.77 30.704-24	Euböa 30.625-10 Standort Nr.)
859 :	884 :	667 kultiviert worden waren.

Betrachtet man die A-,B- und C-Digitoxoside in den einzelnen Tabellen für sich,kommt man zu dem Ergebnis,die Athos-Pflanzen als Vertreter des "DIGITOXIN-TYP",
die Euböa-Pflanzen als Vertreter des "DIGOXIN-TYP" zu bezeichnen.So konnte der signifikante Unterschied im Glykosidmuster der verschiedenen Digitalis leucophaea Herkünfte am treffensten beschrieben werden.

4.)SCHLUSSBETRACHTUNG:

Entscheidungshilfe zur taxonomischen Einordnung der Digitalis leucophaea durch die Untersuchung des gesamten Glykosidmusters.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea Vertreter dreier Standorte bot anhand des hier gewählten Arbeitsganges eine Entscheidungshilfe für die Taxonomie.
Durch die Papierchromatographie gelang zunächst der Anschluß und die Zuordnungsmöglichkeit zu den Glykosidmusterbestimmungen unterschiedlichster Digitalis Arten und Herkünften,die hauptsächlich von Kaiser vorlagen.
Ebenfalls leistete die Papierchromatographie anfangs gute Hilfe zur Interpretation der im weiteren Verlauf des experimentellen Teils dünnschichtchromatographisch erhaltenen Ergebnisse und trug so zur Klärung des Glykosidmusters in den einzelnen Säulenfraktionen bei.

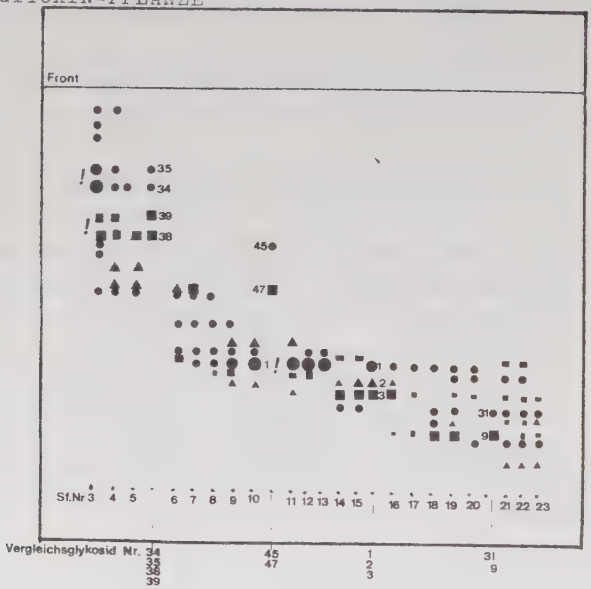
Die Ergebnisse umfassen zwar nur untersuchte Pflanzen jeweils einer Population der Digitalis leucophaea,die aus Samenmaterial dreier unterschiedlicher Standorte kultiviert worden waren, boten aber anhand der Übersicht über das gesamte Glykosidmuster dreier Vertreter die Möglichkeit,der Taxonomie Entscheidungshilfe zu leisten.
So konnte die Durchsicht der erhaltenen Ergebnisse keinen gravierenden Unterschied chemischer Art zum Glykosidmuster der Digitalis lanata erkennbar machen.Die erhaltenen Glykosidmuster der Digitalis leucophaea Vertreter zeigen eher eine sehr nahe Verwandschaft zum Glykosidmuster der Digitalis lanata.
Gravierende Unterschiede im Glykosidmuster boten sich nur im Vergleich der Digitalis leucophaea der drei Standorte untereinander. Sie wurden bereits aufgeführt,lagen aber innerhalb der Variationsbreite des Digitalis lanata Glykosidmusters.

Eine taxonomische Umstellung der Digitalis leucophaea als eigene Art,wie von ZERBST(1973) und Bouquet vorgeschlagen,läßt sich vielleicht morphologisch begründen,nach chemischen Gesichtspunkten aber nicht aufrechterhalten,da das Glykosidmuster in seiner qualitativen und quantitativen Beschaffenheit nur unwesentlich vom Glykosidmuster der Digitalis lanata abweicht.
Es konnten keine auffälligen Abweichungen festgestellt werden,wie sie etwa bei KAISER(1960) in den Tabellen für Digitalis ferruginea, Digitalis parviflora,Digitalis grandiflora oder Digitalis heywoodii zum Glykosidmuster der Digitalis lanata dargestellt sind.
Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung besteht die Einordnung der Digitalis leucophaea als Subspezies der Digitalis lanata zu Recht.

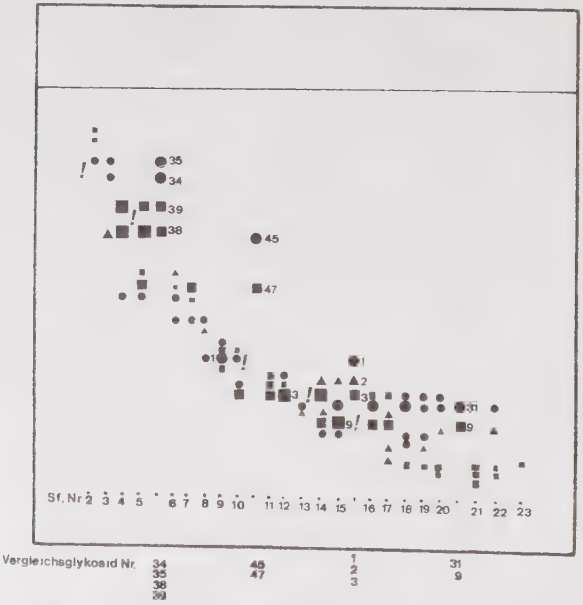
Der beschriebene Unterschied der Digitalis leucophaea "ATHOS" zur Digitalis leucophaea "EUBÖA" soll abschließend noch einmal an schematischen Darstellungen zweier Übersichtschromatogramme gezeigt werden.Da beide,aus Samen von den Athosstandorten kultivierten Pflanzen im Glykosidmuster sehr ähnlich waren, wird für diese Standorte stellvertretend das Glykosidmuster der Digitalis leucophaea"Athos" Nr.77 gezeigt.Die Darstellung umfaßt das gesamte Glykosidmuster dieser Digitalis leucphaea Vertreter und gibt schematisch zwei DC-Platten im Maßstab 1:2 wieder.Durch die Wiedergabe aller Säulenfraktionen auf nur einer Platte enstand ein sehr kompaktes Bild.Es diente nicht der Auswertung,sondern nur der Anschaulichkeit. Immerhin wurde durch diese Methode ein rascher Sofortvergleich(qualitativ) möglich.

Schematische Darstellung von DC-Platten mit dem gesamten Glykosidmuster der Digitalis leucophaea unterschiedlicher ursprünglicher Standorte zum Vergleich:

I. Glykosidmuster der Digitalis leucophaea"Athos":
"DIGITOXIN-PFLANZE"



II. Glykosidmuster der Digitalis leucophaea"Euböa":
"DIGOXIN-PFLANZE"



● = gelbe Fluoreszenz
▲ = grüne-grüngelbe Fluoreszenz
■ = blaue-stahlblaue Fluoreszenz
! = Stellen mit auffälligem Unterschied

Erklärung zur schematischen Darstellung der DC-Platten der Vorseite:

Dargestellt sind die Übersichtschromatogramme des gesamten Glykosidmusters der Digitalis leucophaea"Athos"und"Euböa" zum Vergleich.Es wurden alle Säulenfraktionen der Pflanzenvertreter aufgetragen,einige Leitglykoside liefen ebenfalls mit.Es entstand ein kompakter Überblick,der wesentliche Unterschiede der Glykosidmuster sofort anzeigte,er diente der Orientierung und nicht der Auswertung.

PLATTENMATERIAL:Kieselgel 60F-254(Merck)
FLIESSMITTEL:Äthylacetat 75
Methanol 10
Wasser 7,5
TEMPERATUR: 22°C
LUFTFEUCHTIGKEIT: 49%
DETEKTION:Trichloressigsäure-Chloramin T Reagenz
AUSWERTUNG:UV-Licht 360 nm

Die Startpunkte wurden 2cm vom unteren und seitlichen Plattenrand im Abstand von 0,5cm untereinander markiert.Auf die Startpunkte wurde mit der Mikropipette Microcaps Drummond 20µl von jeder Säulenfraktionslösung und 2µl einiger Vergleichsglykosidlösungen als"Leitglykosid" aufgetragen.Die Front wurde auf 15cm festgelegt.

An Vergleichsglykosidlösungen zur Orientierung wurden aufgetragen:

Lanatosid A+B+C(1+2+3)
α+βAcetyldigitoxin(34+35)
α+βAcetyldigoxin(38+39)
Digitoxin(45)
Digoxin(47)
Desacetyl-lanatosid C(9)
Gluco-digitoxigenin-glucomethylosid(31)

Anhand der unterschiedlichen Symbole,die für die Glykoside der A-(●),B-(▲) und C-(■)Reihe verwendet wurden,kann sofort übersehen werden,daß es sich bei der Digitalis leucophaea "Athos" um eine Pflanze des DIGITOXIN(=A-Typ),bei der Digitalis Leucophaea"Euböa" um eine Pflanze des DIGOXIN(=C-Typ) handelt. Die Stellen der auffälligsten Unterschiede wurden auf den schematischen Darstellungen gekennzeichnet(!).

SCHLUSSBEMERKUNG:

Die Untersuchung des Glykosidmusters der Digitalis leucophaea dreier verschiedener Herkünfte konnte eine Lücke auf dem Gebiet der Digitalis Untersuchungen schließen und gestattete die Übertragung des papierchromatographischen Teils der"klassischen Untersuchungsmethode" auf die elegantere dünnschichtchromatographische Methode.
Allerdings muß sehr bald mit besseren,schnelleren und genaueren Methoden der Glykosidmusterbestimmung gerechnet werden.So zeichnen sich bereits deutliche Fortschritte mit Hilfe der HPLC ab.Die herkömmliche Dünnschichtchromatographie wird früher oder später ebenfalls unter der historischen Entwicklung der Untersuchungsmethoden in der Digitalisforschung zu finden sein.

Doch selbst wenn mehr und mehr modernere Verfahren Anwendung finden,läßt sich die hier beschriebene Methode mit gutem Erfolg selbst im Labor einer Offizinapotheke verwirklichen.Da nach den Vorschriften der Deutschen- und Europäischen Arzneibücher für das Labor der öffentlichen Apotheke Geräte wie:Abzug,DC-Ausrüstung,UV-Detektionsgerät etc. gefordert werden,bedurfte es nur einiger Zusatzgeräte wie:Rotationsverdampfer,PC-Ausrüstung, Mikropipetten und Kölbchen,um die technische Voraussetzung für eine solche Analyse zu schaffen.

Hier sei nochmals Herrn Professor Dr.E.Reinhard herzlich für die Übertragung und Unterstützung dieser außerordentlich interessanten Arbeit gedankt.Es bedeutete eine große Befriedigung festzustellen,daß auch im Labor einer öffentlichen Apotheke Arzneipflanzenforschung betrieben werden konnte und der Kontakt zu Forschung und Lehre nicht verloren ging.

LITERATURVERZEICHNIS:

BOY,H.M.
Umwandlung von Herzglykosiden,Digitoxigenin und Digitoxin-Derivaten durch Zellkulturen von Digitalis lanata.
Dissertation Tübingen(1975)

BÜCHNER,S.A. und STABA,E.J.
Preliminary chemical examinations of Digitalis tissue cultures for cardenolides.
J.Pharm.Pharmacol.16,733(1964)

FURUYA,T.;KOJIMA,H.:Phytochem. 10 1607 (1971)

FURUYA,T.;KOJIMA,H.;KATSUKTA,T.:
Phytochem. 11 1073 (1972)

HAIS,I.M. und MACEK:Handbuch der Papierchromatographie VEB Fischer Verlag Jena.Band 1 459-471

HAMMERSTEIN,F. und KAISER,F.
Quantitative Direktauswertung von Arzneipflanzenextrakten auf Dünnschichtchromatogrammen.
Planta medica 21 ,5(1972)

IMRE,Z. und ERSOY,Ö.
Die Glykoside der Blätter von Digitalis schischkinii.
Arch.Pharm.310 142-151(1977)

JENSEN
Paper chromatography of cardiac glycosides and aglycones from Digitalis purpurea.
Acta pharm.toxicol.Kopenhagen 9 99(1953)

KAISER,F.
Die papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden.
Chem Ber.88 556(1955)

KAISER,F. HAAK,E. SPINGLER,H.
Über die Mono- und Bis-Digitoxoside des Digitoxigenins,Gitoxigenins und Gitaloxigenins.
Liebigs Ann.Chem. 603 75 (1957)

KAISER,F. HAAK,E. SPINGLER,H.
Neue Primärglykoside aus den Blättern von Digitalis lanata.
Liebigs Ann.Chem. 688 216 (1965)

KAISER,F. HAAK,E. SPINGLER,H.
Neue genuine Glykoside aus den Blättern von Digitalis lanata.
Liebigs Ann.Chem. 678 137 (1964)

KAISER,F.
Neue Ergebnisse phytochemischer Untersuchung von Digitalis Arten.
Scient.pharm. 2 17 (1966)

KAISER,F.
Glucodigifucosid,Neo-Glucodigifucosid und Digitoxigenin-allomethylosid aus den Blättern der Digitalis lanata.
Brevi comunicazioni 15.1Q1965

KAISER,F.
CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDE VON DIGITALIS ARTEN.
Arch.Pharm. 299 263 (1966)

KAISER,F.
Die quantitative Glykosidzusammensetzung der Blätter von Digitalis Arten.
Arch.Pharm. 338 201 (1967)

KAISER,F.
Die quantitativen Glykosidzusammensetzungen der Samen von Digitalis Arten.
Arch.Pharm. 338 206 (1967)

KARTNIG,T. KOBOSIL,P.
Zur Trennung der Digitalis-Cardenolide mit Hilfe derHPTLC.
J.Chromatogr. 138 238 (1977)

KUTTER,D. FAUCONNET,L.
L'Hydrolyse des esters formiques par les sels de plomb Application aux cardenolides des digitales.
Pharm.Act.Helv. 33 369 (1958)
Pharm.Act.Helv. 34 200 (1959)

LEWIS,W.
Neues englisches allgemeines Dispensatorium oder Apothekerbuch 366 (1783)

MANNICH,C. SIEWERT,G.
Über g-Strophantin und g-Strophantidin.
Ber.dtsch.chem.Gesell. 75 7 737 (1942)

MANZETTI,REICHSTEIN,MIYATAKE u.a.
Pharm.bull. 5 157 (1957)

MARTHOUD,R.
Dissertation Lyon(1935)

NANASI,LENKEY,TETENYI
Cardenolid glycoside production in Digitalis lanata.
Phytochemystr. 14 1755 (1975)

NOVER,JÜTTNER,BAUMGARTEN,NOAK,LUCKNER
Über die Beziehung zwischen chemischer Struktur und chromatographischen Verhalten bei Herzglykosiden.
Journ.Chromatogr. 39 419 (1969)

PEKIC,B. MILJKOVIC,D.
A new method of preparation of Desacetyl-Lanatosides.
Planta medica 27 178 (1975)

PESEZS,M. :Ann.Pharm.Franc. 10 104 (1952)

RAYMOND,W.D.:Analyst 63 478 (1938)

REINHOLZ,ZAHN
Forschung hat viele Gesichter
Econ Verlag Düsseldorf 117 (1978)

SCHMUTZ,J. REICHSTEIN,T.
Glykoside und Aglykone
21.Mitteilung Pharm.Act.Helv. 22 359 (1947)

SCHOLTZ,K.H.
Zur Verfahrenstechnik der photographischen Dokumentation von Dünnschichtchromatogrammen.
Dtsch.Apoth.Ztg. 114 16 (1974)

SJÖHOLM,I.
Thin layer chromatography of Digitalis Glycosides.
Svensk farm.tidskrift 66 12 301 (1962)

SONANINI,D.
Beiträge zur Dünnschichtchromatographie von Digitalis Cardenoliden.
Pharm.Act.Helv. 39 673 (1964)

STAHL,E.
Chromatographische und mikroskopische Analyse
Springer Verlag,Berlin-Göttingen-Heidelberg;
(1970)

STAHL,E.
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag,Berlin-Göttingen-Heidelberg
II.Aufl. 345 (1967)

STEIDLE,W.
Quantitative Bestimmung von Hexadienoliden
in Meerzwiebelextrakten.
Ann.Chem.662 126 (1963)

STOLL,A. KREIS,W.
Acetyldigitoxin,Acetylgitoxin,Acetyldigoxin.
5.Mitteilung über Herzglykoside
Helv. 16 593 (1933)

STOLL,ANGLIKER,BARFUSS,KUSSMAUL,RENZ
Trennung und Bestimmung herzwirksamer Glykoside
und deren Aglykone durch Chromatographie an
Silicagel.
Helv.Chim.Act. 34 177,1460 (1951)

WALDI,D.
in Stahl:Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg
I.Aufl. 284 (1962)

WERNER,K
Feddes Repetorium 70 109 (1965)
Pharmazie in unserer Zeit 7 2 33(1978)

WICHTL,M.
Methoden der Chemie Bd.12
Akadem.Verlagsgesellschaft Frankfurt-Main
48 (1971)

WICHTL,M.
Digitalis,vom Foxglove zum ß-Methyldigoxin.
Pharm. i.u.Zeit 7 2 48 (1978)

ZERBST,K.J.
Iter Graecum,Bericht
Lehrstuhl für Pharm.Biol.Tübingen(1973)

Lebenslauf

1947	am15.Mai geboren in Essen als Sohn von Alfred und Maria Padberg
1952-1957	Besuch der Volksschule in Essen-Frintrop
1957-1960	Besuch des Gymnasiums Essen-Borbeck
1960-1963	Besuch der Internatsmittelschule Marianum in Fulda
1963-1966	Besuch der Winfriedschule,Aufbaugymnasium in Fulda
1966	am 11.Februar Reifeprüfung
1966-1968	Praktikantenzeit in der Stadtwald-Apotheke,Essen
1968	am 7.März Pharmazeutische Vorprüfung,Düsseldorf
1968	von April bis September Tätigkeit als Vorexaminierter in der Stadtwald-Apotheke
WS1968/69-SS1971	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
1971	am 14.Oktober Pharmazeutische Prüfung und Approbation als Apotheker
1971-1972	Tätigkeit in der Emscher-Apotheke in Essen
1972	am 8.September Heirat mit Apothekerin Ursula Herzog
1972-1973	vom 2.Oktober 1972 Grundwehrdienst
1973	am 2.November Ernennung zum Stabsapotheker
1974	von Januar bis Juni Tätigkeit in der Herkules-Apotheke,Essen von Juli bis Dezember Tätigkeit in der Markus-Apotheke in Essen
1975-1980	seit Februar 1975 Besitzer der Apotheke Am Rabenhorst in Essen
1975	am 22.November Geburt der Tochter Christina
1976	im November Beginn der Dissertation
SS1977-WS1977/78	Ergänzungsstudium der Pharmazie(7.&8. Semester) an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
1979	am 19.Juli Geburt des Sohnes Andreas
1980	im Mai Abschluß der Dissertation

Meine akademischen Lehrer waren:
H.Auterhoff,R.E.Bader,W.Cyran,E.Graf,H.Krüger,H.Lang,
F.Moll,E.Müller,E.Reinhard,H.Remmer,W.Rüdorff,H.Seiler,
K.F.Sewing,H.Uehleke.